临床微生物学手册

Manual of Clinical Microbiology (12th Edition)

第12版

第二卷

● 原著者：Karen C. Carroll ［美］
Michael A. Pfaller ［美］
● 主　译：王　辉　马筱玲　钱　渊
李若瑜　曹建平

中華醫學電子音像出版社
CHINESE MEDICAL MULTIMEDIA PRESS

责任编辑：赵文羽

封面设计：金舵手世纪

AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY

中华医学会

序号：1914 0161 07565

ISBN 978-7-83005-331-4

9 787830 053314 >

定价：600.00 元

临床微生物学手册

第12版

Manual of Clinical Microbiology (12th Edition)

● 原著者：Karen C. Carroll［美］
Michael A. Pfaller［美］
●主　译：王　辉　马筱玲　钱　渊
李若瑜　曹建平

第二卷

中华医学电子音像出版社
CHINESE MEDICAL MULTIMEDIA PRESS
北　京

图书在版编目（CIP）数据

临床微生物学手册：第 12 版．第二卷/（美）凯伦·C. 卡罗尔（Karen C. Carroll）主编；王辉等译．—北京：中华医学电子音像出版社，2021. 3
ISBN 978-7-83005-331-4

Ⅰ.①临… Ⅱ.①凯… ②王… Ⅲ.①微生物学—医学检验—手册
Ⅳ.①R446. 5-62

中国版本图书馆 CIP 数据核字（2020）第 252064 号

北京市版权局著作权合同登记章图字：01-2020-7130 号

临床微生物学手册(第 12 版)·第二卷
LINCHUANG WEISHENGWUXUE SHOUCE (DI 12 BAN) Ⅱ

主　　译：王　辉　马筱玲　钱　渊　李若瑜　曹建平
策划编辑：裴　燕　赵文羽
责任编辑：赵文羽
文字编辑：宫宇婷　周寇扣　孙葵葵　崔晓鸥　武　昱
校　　对：龚利霞
责任印刷：李振坤
出版发行：中华医学电子音像出版社
通信地址：北京市西城区东河沿街 69 号中华医学会 610 室
邮　　编：100052
E - mail：cma-cmc@cma. org. cn
购书热线：010-51322677
经　　销：新华书店
印　　刷：北京顶佳世纪印刷有限公司
开　　本：889mm×1194mm　1/16
印　　张：83. 75
字　　数：2290 千字
版　　次：2021 年 3 月第 1 版　2021 年 3 月第 1 次印刷
定　　价：600. 00 元

译者名单

主　　审　陈民钧　汤一苇　倪语星

主　　译　王　辉　马筱玲　钱　渊　李若瑜　曹建平

副 主 译　俞云松　曹　彬　胡必杰　孙自镛　苏建荣　刘文恩

　　　　　陈家旭　陆　玲　宁永忠

译　　者（按姓氏拼音排序）

白志宇　天津市海河医院

曹　彬　中日友好医院

曹建平　中国疾病预防控制中心寄生虫病预防控制所

曹敬荣　首都医科大学宣武医院

陈　茶　广州中医药大学第二附属医院，广东省中医院

陈宏斌　北京大学人民医院

陈家旭　中国疾病预防控制中心寄生虫病预防控制所

陈民钧　中国医学科学院北京协和医院

陈中举　华中科技大学同济医学院附属同济医院

褚云卓　中国医科大学附属第一医院

崔仑标　江苏省疾病预防控制中心

戴二黑　石家庄市第五医院

戴媛媛　中国科学技术大学附属第一医院

杜　鸿　苏州大学附属第二医院

杜　艳　昆明医科大学第一附属医院

福　泉　内蒙古医科大学附属医院

付英梅　哈尔滨医科大学

耿　燕　西安交通大学第二附属医院

公衍文　山东大学第二医院

顾　兵　徐州医科大学附属医院

郭大文　哈尔滨医科大学附属第一医院

韩立中　上海交通大学医学院附属瑞金医院

韩晓旭　中国医科大学附属第一医院

侯铁英　广东省人民医院

胡必杰　复旦大学附属中山医院

胡付品　复旦大学附属华山医院

胡继红　国家卫生健康委临床检验中心

胡　媛　中国疾病预防控制中心寄生虫病预防控制所

胡云建　北京医院

胡志东　天津医科大学总医院

黄　磊　北京大学第一医院
季　萍　新疆医科大学第一附属医院
贾　伟　宁夏医科大学总医院
金大智　杭州医学院
李荷楠　北京大学人民医院
李　敏　上海交通大学医学院附属仁济医院
李佩珊　南方医科大学第五附属医院
李若瑜　北京大学第一医院
李向阳　温州医科大学附属第二医院
李　轶　河南省人民医院检验科
梁宏洁　广西医科大学第一附属医院
廖　康　中山大学附属第一医院
刘根焰　南京医科大学第一附属医院
刘家云　空军军医大学第一附属医院
刘文恩　中南大学湘雅医院
刘　瑛　上海交通大学医学院附属新华医院
刘颖梅　中日友好医院
刘泽世　西安交通大学第二附属医院
鲁炳怀　中日友好医院
陆　玲　南京师范大学
罗燕萍　中国人民解放军总医院第一医学中心
吕火烊　浙江省人民医院
马筱玲　中国科学技术大学附属第一医院
马　莹　四川大学华西医院
穆　红　天津市第一中心医院
倪语星　上海交通大学医学院附属瑞金医院
宁永忠　清华大学附属垂杨柳医院
彭　静　华中科技大学同济医学院附属同济医院
钱　渊　首都儿科研究所
屈平华　广州中医药大学第二附属医院，广东省中医院
曲久鑫　深圳市第三人民医院
单　斌　昆明医科大学第一附属医院
沈　鸿　首都医科大学附属北京朝阳医院
芮勇宇　南方医科大学南方医院
苏丹虹　广州医科大学附属第一医院
苏建荣　首都医科大学附属北京友谊医院
孙恩华　山东大学齐鲁医院
孙宏莉　中国医学科学院北京协和医院
孙立颖　北京大学第一医院

孙自镛 华中科技大学同济医学院附属同济医院
汤一苇 美国丹纳赫集团中国诊断平台
陶传敏 四川大学华西医院
田瑞卿 保定市第一医院
王大燕 中国疾病预防控制中心病毒病预防控制所
王红梅 郑州大学第一附属医院
王 辉 北京大学人民医院
王利君 北京清华长庚医院
王 倩 中国医科大学附属第一医院
王一民 中日友好医院
隗 明 首都医科大学附属北京朝阳医院
魏莲花 甘肃省人民医院
吴文娟 同济大学附属东方医院
伍 勇 中南大学湘雅三医院
徐春晖 中国医学科学院血液病医院(中国医学科学院血液学研究所)
徐和平 厦门大学附属第一医院
徐修礼 空军军医大学第一附属医院
徐元宏 安徽医科大学附属第一医院
许建成 吉林大学白求恩第一医院
杨 滨 福建医科大学附属第一医院
杨 青 浙江大学医学院附属第一医院
杨天赐 厦门大学附属中山医院
杨晓莉 中国人民解放军总医院第三医学中心
杨志宁 山西省心血管病医院
姚开虎 首都医科大学附属北京儿童医院,北京市儿科研究所
余方友 同济大学附属上海市肺科医院
俞云松 浙江大学医学院附属邵逸夫医院
喻 华 四川省医学科学院·四川省人民医院
曾 吉 华中科技大学同济医学院附属普爱医院
张红梅 石河子大学医学院第一附属医院
张利军 重庆医科大学附属第二医院
张 嵘 浙江大学医学院附属第二医院
张晓龙 中国检验检疫科学研究院
张蕴莉 锦州医科大学附属第一医院
赵建宏 河北医科大学第二医院
赵宗珉 中国医科大学附属第一医院
周宏伟 南方医科大学珠江医院
朱 镭 山西省儿童医院山西省妇幼保健院
邹明祥 中南大学湘雅医院

原著编辑委员会

原著撰稿者

APRIL N. ABBOTT
Department of Laboratory Medicine, Deaconess Health System, Evansville, Indiana

STEPHAN W. ABERLE
Center for Virology, Medical University of Vienna, Vienna, Austria

SINA M. ADL
University of Saskatchewan, Soil Sciences, College of Agriculture, Saskatoon, Saskatchewan, Canada

MARIA E. AGUERO-ROSENFELD
New York University Langone Health, Pathology, New York, New York

SARAH ABDALLAH AHMED
Westerdijk Fungal Biodiversity Institute, Utrecht, The Netherlands

ALEXANDRE ALANIO
Unité Mycologie Moléculaire, CNRS UMR2000, Centre National de Référence des Mycoses Invasives et Antifongiques, Institut Pasteur, 75724 Paris cedex 15, France

KEVIN ALBY
Department of Pathology and Laboratory Medicine, University of Pennsylvania, Philadelphia, Pennsylvania

DAVID C. ALEXANDER
Cadham Provincial Laboratory and Department of Medical Microbiology & Infectious Diseases, University of Manitoba, Winnipeg, Manitoba, Canada

IBNE M. KARIM ALI
National Center for Emerging and Zoonotic Infectious Diseases, Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, Georgia

GEORGE F. ARAJ
Department of Pathology and Laboratory Medicine, American University of Beirut Medical Center, Beirut, Lebanon

MATTHEW J. ARDUINO
Division of Healthcare Quality Promotion, National Center for Emerging and Zoonotic Infectious Diseases, Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, Georgia

H. RUTH ASHBEE
School of Molecular and Cellular Biology, Faculty of Biological Sciences, University of Leeds, Leeds, United Kingdom

RONALD M. ATLAS
Department of Biology, University of Louisville, Louisville, Kentucky (Retired)

ROBERT L. ATMAR
Departments of Medicine and Molecular Virology & Microbiology, Baylor College of Medicine, Houston, Texas

N. ESTHER BABADY
Department of Laboratory Medicine, Memorial Sloan-Kettering Cancer Center, New York, New York

FAUSTO BALDANTI
Department of Clinical, Surgical, Diagnostics and Pediatric Sciences, University of Pavia, and Molecular Virology Unit, Fondazione IRCCS Policlinico San Matteo, Pavia, Italy

MATTHEW J. BANKOWSKI
Baptist Medical Center Jacksonville, Infectious Diagnostics Laboratory, Jacksonville, Florida

FRÉDÉRIC BARBUT
National Reference Laboratory for Clostridium difficile, Hôpital Saint-Antoine, and EA4065, Université Paris Descartes, Paris, France

JENNIFER DIEN BARD
Department of Pathology and Laboratory Medicine, Children's Hospital Los Angeles, Keck School of Medicine, University of Southern California, Los Angeles, California

CÉCILE BÉBÉAR
USC EA 3671, University of Bordeaux, Department of Bacteriology, French National Reference Center for bacterial STI, Bordeaux University Hospital, Bordeaux, France

KARSTEN BECKER
University Hospital Münster, Institute of Medical Microbiology, Münster, Germany

ELIZABETH L. BERKOW
Centers for Disease Control and Prevention, Mycotic Diseases Branch, Atlanta, Georgia

KATHRYN A. BERNARD
National Microbiology Laboratory-CSCHAH, Public Health Agency of Canada, and Department of Medical Microbiology, University of Manitoba, Winnipeg, Manitoba, Canada

BEVERLEY-ANN BIGGS
Victorian Infectious Diseases Service, Royal Melbourne Hospital, Parkville, Victoria, and Department of Medicine at the Peter Doherty Institute for Infection and Immunity, University of Melbourne, Melbourne, Australia

THOMAS BJARNSHOLT
Department of Clinical Microbiology, Rigshospitalet, and Department of Immunology and Microbiology, Costerton Biofilm Center, Faculty of Health and Medical Sciences, University of Copenhagen, Copenhagen, Denmark

LUCAS S. BLANTON
Department of Internal Medicine – Infectious Diseases, University of Texas Medical Branch, Galveston, Texas

CHANTAL BLEEKER-ROVERS
Radboud University Medical Center, Department of Internal Medicine, and Radboud Expertise Center for Q Fever, Nijmegen, The Netherlands

CHRISTIAN BOGDAN
Mikrobiologisches Institut - Klinische Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene, Friedrich-Alexander-Universität (FAU) Erlangen-Nürnberg und Universitätsklinikum Erlangen, Erlangen, Germany

GUY BOIVIN
Department of Microbiology and Infectious Diseases, Laval University, Quebec City, QC, Canada

ANDREW M. BORMAN
United Kingdom National Mycology Reference Laboratory, Public Health England, Bristol, United Kingdom

YAN BOUCHER
University of Alberta, Edmonton, Alberta, Canada

DONALD H. BOUYER
Department of Pathology, University of Texas Medical Branch, Galveston, Texas

PATRICIA A. BRADFORD
Antimicrobial Development Specialists, LLC, Nyack, New York

CLAUDIA BRANDT
Institute for Medical Microbiology and Infection Control, University Hospital, Goethe University, Frankfurt, Germany

MARY E. BRANDT
Office of Laboratory Science and Safety, Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, Georgia

KEVIN E. BROWN
Virus Reference Department, Public Health England, London, United Kingdom

BARBARA A. BROWN-ELLIOTT
Department of Microbiology, The University of Texas Health Science Center at Tyler, Department of Microbiology, Tyler, Texas

DAVID A. BRUCKNER
Department of Pathology & Laboratory Medicine, David Geffen School of Medicine, University of California, Los Angeles, Los Angeles, California

BLAKE W. BUCHAN
Medical College of Wisconsin and Wisconsin Diagnostic Laboratories, Milwaukee, Wisconsin

RICHARD S. BULLER
Department of Pediatrics, Washington University School of Medicine, St. Louis, Missouri

SUSAN M. BUTLER-WU
Department of Pathology and Laboratory Medicine, Keck School of Medicine of USC, Los Angeles, California

ANGELA M. CALIENDO
Alpert Medical School of Brown University, Providence, Rhode Island

VITALIANO CAMA
Division of Parasitic Diseases and Malaria, Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, Georgia

GERALD A. CAPRARO
Carolinas HealthCare System, Clinical Microbiology, Charlotte, North Carolina

DARCIE E. CARPENTER
IHMA, Inc., Schaumburg, Illinois

KAREN C. CARROLL
Division of Medical Microbiology, Department of Pathology, The Johns Hopkins University School of Medicine, Baltimore, Maryland

MARIA DA GLÓRIA SIQUEIRA CARVALHO
Streptococcus Laboratory, Respiratory Diseases Branch, Division of Bacterial Diseases, Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, Georgia

MARIANA CASTANHEIRA
JMI Laboratories, North Liberty, Iowa

ADAM J. CAULFIELD
Spectrum Health Regional Laboratory, Grand Rapids, Michigan

MAIKEN CAVLING-ARENDRUP
Department of Microbiology & Infection Control, Statens Serum Institut; Department of Clinical Microbiology, Rigshospitalet; and Department of Clinical Medicine, University of Copenhagen, Copenhagen, Denmark

ANGELLA CHARNOT-KATSIKAS
Department of Pathology, University of Chicago, Chicago, Illinois

SHARON C.-A. CHEN
Westmead Hospital, Infectious Diseases, Westmead, NSW 2145, Australia

MAX CHERNESKY
Pediatrics, Pathology and Molecular Medicine, McMaster University/St Josephs Healthcare, Hamilton, Ontario, Canada

CHENG-FENG CHIANG
Viral Special Pathogens Branch, Division of High Consequence Pathogens and Pathology, National Center for Emerging and Zoonotic Infectious Diseases, Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, Georgia

SUNWEN CHOU
Department of Medicine, Oregon Health and Sciences University, Portland, Oregon

JENS JØRGEN CHRISTENSEN
Institute of Clinical Medicine, University of Copenhagen, and Department of Clinical Microbiology, Slagelse Hospital, Slagelse, Denmark

OANA CIOFU
Department of Immunology and Microbiology, Costerton Biofilm Center, Faculty of Health and Medical Sciences, University of Copenhagen, Copenhagen, Denmark

JÉRÔME CLAIN
UMR 216 IRD MERIT, Faculty of Pharmacy, Paris Descartes University, 75006 Paris, France

BRYAN R. COBB
Roche Molecular Systems, Pleasanton, California

TOM COENYE
Laboratory of Pharmaceutical Microbiology, Ghent University, Ghent, Belgium

GEORG CONRADS
Division of Oral Microbiology and Immunology, RWTH Aachen University Hospital, Aachen, Germany

PATRICIA S. CONVILLE
Division of Microbiology Devices, Office of In-Vitro Diagnostics and Radiological Health, Center for Devices and Radiological Health, Food and Drug Administration, Silver Spring, Maryland

PIET COOLS
Laboratory Bacteriology Research, Department of Microbiology, Immunology and Clinical Chemistry, Faculty of Medicine and Health Sciences, Ghent University, Ghent, Belgium

JENNIFER R. COPE
National Center for Emerging and Zoonotic Infectious Diseases, Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, Georgia

MARC ROGER COUTURIER
University of Utah/ARUP Laboratories, Pathology/Infectious Disease Microbiology, Salt Lake City, Utah

BART J. CURRIE
Menzies School of Health Research and Northern Territory Medical Program, Royal Darwin Hospital, Darwin, Northern Territory, Australia

KATE CUSCHIERI
Scottish HPV Reference Laboratory, Department of Laboratory Medicine, Royal Infirmary of Edinburgh, Edinburgh, Scotland

MELANIE T. CUSHION
Department of Internal Medicine, Division of Infectious Diseases, University of Cincinnati College of Medicine, and the Cincinnati VA Medical Center, Cincinnati, Ohio

STEVEN D. DALLAS
UT Health San Antonio, Department of Pathology and Laboratory Medicine, San Antonio, Texas

INGER K. DAMON
Centers for Disease Control and Prevention, Division of High Consequence Pathogens and Pathology, Atlanta, Georgia

G. SYBREN DE HOOG
Westerdijk Fungal Biodiversity Institute, Utrecht, The Netherlands

JOHN DEKKER
National Institutes of Health, Bethesda, Maryland

PETER DEPLAZES
Institute of Parasitology, University of Zurich, Zurich, Switzerland

EDWARD P. DESMOND
Mycobacteriology Section, Microbial Diseases Laboratory, California Department of Public Health, Richmond, California

DANIEL J. DIEKEMA
Division of Infectious Diseases, Department of Internal Medicine, and Division of Medical Microbiology, Department of Pathology, University of Iowa College of Medicine, Iowa City, Iowa

ELIZABETH A. DIETRICH
Bacterial Diseases Branch, Division of Vector-Borne Diseases, Centers for Disease Control and Prevention, Fort Collins, Colorado

CHRISTOPHER D. DOERN
Department of Pathology, Virginia Commonwealth University Medical Center, Richmond, Virginia

SHEILA C. DOLLARD
Division of Viral Diseases, Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, Georgia

FRANÇOISE DROMER
Institut Pasteur, Unité de Mycologie Moléculaire, Centre National de Référence des Mycoses Invasives et Antifongiques, CNRS UMR2000, Paris, France

J. STEPHEN DUMLER
Joint Departments of Pathology, Uniformed Services University of the Health Sciences, Walter Reed National Military Medical Center, Joint Pathology Center, Bethesda, Maryland

JAMES J. DUNN
Department of Pathology, Texas Children's Hospital, and Department of Pathology and Immunology, Baylor College of Medicine, Houston, Texas

PAUL H. EDELSTEIN
University of Pennsylvania Perelman School of Medicine, Pathology and Laboratory Medicine, Philadelphia, Pennsylvania

JOHANNES ELIAS
Instiute of Microbiology, DRK Kliniken Berlin, Berlin, Germany

HERMES ESCALANTE
Universidad Nacional de Trujillo, Trujillo, Peru

RICHARD R. FACKLAM
Streptococcus Laboratory, Respiratory Diseases Branch, Division of Bacterial Diseases, Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, Georgia

FERRIC C. FANG
Departments of Laboratory Medicine and Microbiology, University of Washington School of Medicine, Seattle, Washington

JOHN J. FARMER III
United States Public Health Service (Retired), Stone Mountain, Georgia

MATTHEW L. FARON
Medical College of Wisconsin, Milwaukee, Wisconsin

MICHAEL S. FORMAN
Division of Medical Microbiology, Department of Pathology, The Johns Hopkins Medical Institutions, Baltimore, Maryland

STEPHEN J. FORSYTHE
foodmicrobe.com, Nottingham, United Kingdom

KAREN M. FRANK
Department of Laboratory Medicine, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland

MATTHIAS FROSCH
Institute of Hygiene and Microbiology, University of Wuerzburg, Wuerzburg, Germany

NAOMI J. GADSBY
Royal Infirmary of Edinburgh, Specialist Virology Centre, Dept. Laboratory Medicine, Edinburgh, Lothian EH16 4SA, United Kingdom

RENEE L. GALLOWAY
Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, Georgia

BHANU P. GANESH
Department of Neurology, The University of Texas Health Science Center at Houston, Houston, Texas

HECTOR H. GARCIA
Universidad Peruana Cayetano Heredia, Center for Global Health, Lima, Peru

LYNNE S. GARCIA
LSG & Associates, Santa Monica, California

DEA GARCIA-HERMOSO
Unité Mycologie Moléculaire, CNRS UMR2000, Centre National de Référence des Mycoses Invasives et Antifongiques, Institut Pasteur, 75724 Paris cedex 15, France

BARBARA C. GÄRTNER
Institute for Microbiology and Hygiene, Saarland University, Faculty of Medicine and Medical Center, Homburg/Saar, Germany

WALTER GEIßDÖRFER
Mikrobiologisches Institut - Klinische Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene, Friedrich-Alexander-Universität (FAU) Erlangen-Nürnberg and Universitätsklinikum Erlangen, Erlangen, Germany

PETER GERNER-SMIDT
National Center for Emerging and Zoonotic Infectious Diseases, Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, Georgia

CHRISTINE C. GINOCCHIO
Medical Affairs, bioMérieux/BioFire Diagnostics, Durham, North Carolina

WILLIAM A. GLOVER II
Washington State Public Health Laboratories, Shoreline, Washington

BEATRIZ L. GÓMEZ GIRALDO
School of Medicine and Health Sciences, Translational Microbiology and Emerging Diseases Group (MICROS), Universidad del Rosario, Bogotá, Colombia

MARK D. GONZALEZ
Department of Pathology, Children's Healthcare of Atlanta, Atlanta, Georgia

ALEXANDER L. GRENINGER
Department of Laboratory Medicine, University of Washington, and Vaccine and Infectious Disease Division, Fred Hutchinson Cancer Research Center, Seattle, Washington

JOSEP GUARRO
Universitat Rovira i Virgili, Mycology Unit, Medical School and IISPV, Reus, Spain

CLIFFORD J. GUNTHEL
Infectious Disease Program, Grady Health System, Emory University School of Medicine, Atlanta, Georgia

CATRIONA L. HALLIDAY
Westmead Hospital, Infectious Diseases, Westmead, NSW 2145, Australia

RANDALL T. HAYDEN
Department of Pathology, St. Jude Children's Research Hospital, Memphis, Tennessee

ALBERT HEIM
Hannover Medical School, Virology, Hannover, Germany

WALID HENEINE
Division of HIV/AIDS Prevention, National Center for HIV/AIDS, Viral Hepatitis, STD, and TB Prevention, Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, Georgia

CAROLE J. HICKMAN
Viral Vaccine Preventable Diseases Branch, Division of Viral Diseases, Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, Georgia

SARAH K. HIGHLANDER
Pathogen and Microbiome Division, Translational Genomics Research Institute, Flagstaff, Arizona

RICHARD L. HODINKA
Department of Biomedical Sciences, University of South Carolina School of Medicine Greenville and Greenville Health System, Greenville, South Carolina

NIELS HØIBY
Department of Clinical Microbiology, Rigshospitalet, and Department of Immunology and Microbiology, Costerton Biofilm Center, Faculty of Health and Medical Sciences, University of Copenhagen, Copenhagen, Denmark

MARTIN HOLFELDER
Department of Microbiology, Limbach Laboratory, Heidelberg, Germany

AMY J. HORNEMAN
VA Maryland Health Care System, Pathology and Laboratory Service, Baltimore, Maryland

REBECCA T. HORVAT
Department of Pathology and Laboratory Medicine, University of Kansas School of Medicine, Kansas City, Kansas

DIANA D. HUANG
Department of Microbial Pathogens and Immunity, Rush University Medical Center, Chicago, Illinois

ROMNEY M. HUMPHRIES
Accelerate Diagnostics, Tucson, and Department of Pathology and Laboratory Medicine, University of Arizona, Tucson, Arizona

ELIZABETH A. HUNSPERGER
Diagnostics and Laboratory Systems Program, Centers for Disease Control and Prevention, Centers for Global Health, Division of Global Health Protection, Nairobi, Kenya

JOSEPH P. ICENOGLE
Viral Vaccine Preventable Diseases Branch, Division of Viral Diseases, Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, Georgia

JACQUES IZOPET
Department of Virology, National Reference Center for Hepatitis E virus, CHU Toulouse, and Center for Pathophysiology of Toulouse-Purpan, INSERM UMR1043 / CNRS UMR 5282, CPTP, Toulouse University Paul Sabatier, Toulouse, France

KEITH R. JEROME
Department of Laboratory Medicine, University of Washington, Vaccine and Infectious Disease Division, Fred Hutchinson Cancer Research Center, Seattle, Washington

JUAN A. JIMENEZ
Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Laboratorio de Parasitología en Fauna Silvestre y Zoonosis, Lima, Peru

CRYSTAL N. JOHNSON
APC Microbiome Institute and Teagasc Food Research Centre, Moorepark Biosciences Department, Fermoy, Co. Cork, Ireland

ELIZABETH M. JOHNSON
Mycology Reference Laboratory, Public Health England National Infection Service, Bristol, United Kingdom

MALCOLM K. JONES
School of Veterinary Sciences, The University of Queensland, Brisbane, Qld 4072, Australia

JAMES H. JORGENSEN
University of Texas Health Science Center at San Antonio, San Antonio, Texas

NASSIM KAMAR
Center for Pathophysiology of Toulouse-Purpan, INSERM UMR1043 / CNRS UMR 5282, CPTP, Toulouse University Paul Sabatier, and Department of Nephrology and Organ Transplantation, CHU Toulouse, Toulouse, France

PETER KÄMPFER
Institut für Angewandte Mikrobiologie, Universität Giessen, Giessen, Germany

JAMES A. KARLOWSKY
Department of Medical Microbiology and Infectious Diseases, University of Manitoba, Winnipeg, Manitoba, Canada

JENNIFER KEISER
Department of Medical Parasitology and Infection Biology, Swiss Tropical and Public Health Institute, CH-4002 Basel, Switzerland

NANCY P. KELLER
University of Wisconsin-Madison, Medical Microbiology and Immunology and Bacteriology, Madison, Wisconsin

GILBERT J. KERSH
Centers for Disease Control and Prevention, Rickettsial Zoonoses Branch, Atlanta, Georgia

PAUL E. KILGORE
Eugene Applebaum College of Pharmacy and Health Sciences and Department of Family Medicine and Public Health Sciences, School of Medicine, Wayne State University, Detroit, Michigan

LUKE C. KINGRY
Bacterial Diseases Branch, Division of Vector-Borne Diseases, Centers for Disease Control and Prevention, Fort Collins, Colorado

JOHN D. KLENA
Viral Special Pathogens Branch, Division of High Consequence Pathogens and Pathology, National Center for Emerging and Zoonotic Infectious Diseases, Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, Georgia

LAURA M. KOETH
Laboratory Specialists, Inc., Westlake, Ohio

EIJA KÖNÖNEN
Institute of Dentistry, University of Turku, Turku, Finland

THOMAS G. KSIAZEK
Galveston National Laboratory, Department of Pathology, University of Texas Medical Branch, Galveston, Texas

ED KUIJPER
Department of Medical Microbiology, Leiden University Medical Centre, 2333 ZA Leiden, The Netherlands

JAIME LABARCA
Departamento de Enfermedades Infecciosas, Escuela de Medicina, Pontificia Universidad Católica de Chile, Diagonal Paraguay 362, Santiago 8330077, Chile

PHILIPPE LAGACÉ-WIENS
Diagnostic Services, Shared Health, and Department of Medical Microbiology and Infectious Diseases, Max Rady College of Medicine, University of Manitoba, Winnipeg, Manitoba, Canada

DARYL M. LAMSON
Division of Infectious Diseases, Wadsworth Center, New York State Department of Health, Albany, New York

BRIGITTE LAMY
CHU Nice, Université Côte d'Azur and INSERM U1065, Bactériologie, Nice, France

MARIE LOUISE LANDRY
Laboratory Medicine and Internal Medicine, Yale University, New Haven, Connecticut

PAUL A. LAWSON
Department of Microbiology and Plant Biology, University of Oklahoma, Norman, Oklahoma

JACQUES LE BRAS
UMR 216 IRD MERIT, Faculty of Pharmacy, Paris Descartes University, 75006 Paris, France

AMY L. LEBER
Nationwide Children's Hospital, Clinical Microbiology and Immunoserology, Department of Laboratory Medicine, Columbus, Ohio

NATHAN A. LEDEBOER
Department of Pathology, Medical College of Wisconsin, Milwaukee, Wisconsin

KARIN LEDER
Infectious Disease Epidemiology Unit, School of Epidemiology and Preventive Medicine, Monash University, Victorian Infectious Disease Service, Royal Melbourne Hospital, Victoria, Australia

ELLIOT J. LEFKOWITZ
Department of Microbiology, The University of Alabama at Birmingham, Birmingham, Alabama

DIANE S. LELAND
Department of Pathology and Laboratory Medicine, Indiana University School of Medicine, Indianapolis, Indiana

PAUL N. LEVETT
BC Centre for Disease Control Public Health Laboratory, Vancouver, British Columbia, Canada

JAMES S. LEWIS, II
Oregon Health and Science University, Departments of Pharmacy & Infectious Diseases, Portland, Oregon

SHOU-YEAN GRACE LIN
Mycobacteriology Section, Microbial Diseases Laboratory, California Department of Public Health, Richmond, California

DAVID S. LINDSAY
Virginia Tech, Biomedical Sciences and Pathobiology, Blacksburg, Virginia

MARK D. LINDSLEY
Mycotic Diseases Branch, Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, Georgia

ANDREA J. LINSCOTT
Ochsner Medical Center, Department of Pathology and Laboratory Medicine, New Orleans, Louisiana

JOHN J. LiPUMA
Department of Pediatrics and Communicable Diseases, University of Michigan Medical School, Ann Arbor, Michigan

SHAWN R. LOCKHART
Mycotic Diseases Branch, National Center for Emerging and Zoonotic Infectious Diseases, Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, Georgia

MICHAEL LOEFFELHOLZ
Department of Pathology and Clinical Microbiology Laboratory, University of Texas Medical Branch, Galveston, Texas

XIAOYAN LU
Division of Viral Diseases, Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, Georgia

NELL S. LURAIN
Department of Microbial Pathogens and Immunity, Rush University Medical Center, Chicago, Illinois

DUNCAN MacCANNELL
National Center for Emerging and Zoonotic Infectious Diseases, Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, Georgia

HUGO MADRID
Universidad Mayor, Centro de Genómica y Bioinformática, Santiago, Chile

STEVEN D. MAHLEN
Affiliated Laboratory, Inc., Clinical Microbiology, Bangor, Maine

ISABELLA MARTIN
Pathology, Dartmouth-Hitchcock Medical Center, Lebanon, New Hampshire

ALEXANDER MATHIS
Institute of Parasitology, University of Zurich, Zurich, Switzerland

BLAINE MATHISON
ARUP Laboratories, Infectious Disease Division, Salt Lake City, Utah

JAMES B. McAULEY
Rush University Medical Center, Chicago, Illinois

GERALD McDONNELL
DePuy Synthes Companies, Johnson & Johnson, Raritan, New Jersey

ERIN McELVANIA
Pathology, Evanston Hospital/NorthShore University HealthSystem, Evanston, Illinois

KARIN L. McGOWAN
University of Pennsylvania, Department of Pathology and Laboratory Medicine, Perelman School of Medicine, Philadelphia, Pennsylvania (Emeritus)

SARAH L. McGUINNESS
Infectious Disease Epidemiology Unit, School of Epidemiology and Preventive Medicine, Monash University, Department of Infectious Diseases, The Alfred Hospital, Victoria, Australia

DONALD P. McMANUS
QIMR Berghofer Medical Research Institute, Herston, Queensland 4006, Australia

LEONEL MENDOZA
Michigan State University, Microbiology and Molecular Genetics, East Lansing, Michigan

WIELAND MEYER
Westmead Millennium Institute for Medical Research, Infectious Diseases, Westmead, NSW 2145, Australia

LINDA A. FEDERICI MILLER
CMID Pharma Consulting, LLC, Dresher, Pennsylvania

RHODA ASHLEY MORROW
University of Washington and Fred Hutchinson Cancer Research Center, Seattle, Washington

ANNETTE MOTER
Charité-Universitätsmedizin Berlin, Biofilmzentrum des Deutschen Herzzentrums Berlin, Berlin, Germany

IONA MUNJAL
Department of Pediatrics, Montefiore Medical Center and Albert Einstein College of Medicine, and Pfizer Vaccine Clinical Research & Development, Bronx, New York

IRVING NACHAMKIN
Department of Pathology and Laboratory Medicine, Perelman School of Medicine, University of Pennsylvania, Philadelphia, Pennsylvania

ELISABETH NAGY
Institute of Clinical Microbiology, University of Szeged, Szeged, Hungary

RONALD C. NEAFIE
Retired, Former Armed Forces Institute of Pathology, Washington, DC

ALEXANDR NEMEC
Laboratory of Bacterial Genetics, Centre for Epidemiology and Microbiology, National Institute of Public Health, Prague, Czech Republic

TERRY FEI FAN NG
National Center for Immunization and Respiratory Diseases, Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, Georgia

XIAOHUI CHEN NIELSEN
Department of Clinical Microbiology, Slagelse Hospital, Slagelse, Denmark

FREDERICK S. NOLTE
Department of Pathology and Laboratory Medicine, Medical University of South Carolina, Charleston, South Carolina

CARMELLE T. NORICE-TRA
Laboratory of Parasitic Diseases, National Institute of Allergy and Infectious Diseases, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland

NIELS NØRSKOV-LAURITSEN
Clinical Microbiology, Aarhus University Hospital, Aarhus, Denmark

SUSAN NOVAK-WEEKLEY
Qvella, Carlsbad, California

THOMAS B. NUTMAN
Laboratory of Parasitic Diseases, National Institute of Allergy and Infectious Diseases, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland

KERRY O'DONNELL
Mycotoxin Prevention and Applied Microbiology Research Unit, National Center for Agricultural Utilization Research, ARS-USDA, Peoria, Illinois

VICTORIA A. OLSON
Poxvirus and Rabies Branch, Division of High Consequence Pathogens and Pathologies, Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, Georgia

LILLIAN A. ORCIARI
Poxvirus and Rabies Branch, Division of High Consequence Pathogens and Pathologies, Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, Georgia

OLIVIER ORTHOLARY
Unité Mycologie Moléculaire, CNRS UMR2000, Centre National de Référence des Mycoses Invasives et Antifongiques, Institut Pasteur, 75724 Paris cedex 15, France

BELINDA OSTROWSKY
Department of Medicine, Division of Infectious Disease, Montefiore Medical Center and Albert Einstein College of Medicine, Bronx, New York

S. MICHELE OWEN
National Center for HIV/AIDS, Viral Hepatitis, STD, and TB Prevention, Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, Georgia

GRAEME P. PALTRIDGE
Canterbury Health Laboratories, Microbiology Laboratory, Christchurch 8011, New Zealand

XIAOLI PANG
Provincial Laboratory for Public Health and Department of Laboratory Medicine and Pathology, University of Alberta, Edmonton, Alberta, Canada

NICOLE PARRISH
Pathology, Johns Hopkins University, Baltimore, Maryland

ROBIN PATEL
Infectious Diseases Research Laboratory, Mayo Clinic, Rochester, Minnesota

SHARON J. PEACOCK
Department of Medicine, University of Cambridge, Addenbrooke's Hospital, Cambridge, United Kingdom

MICHAEL PENTELLA
University of Iowa, College of Public Health, Department of Epidemiology, Iowa City, Iowa

DAVID S. PERLIN
Public Health Research Institute, New Jersey Medical School, Rutgers Biomedical and Health Sciences, Newark, New Jersey

JEANNINE M. PETERSEN
Bacterial Diseases Branch, Division of Vector-Borne Diseases, Centers for Disease Control and Prevention, Fort Collins, Colorado

JOSEPH F. PETROSINO
Department of Molecular Virology & Microbiology, Baylor College of Medicine, Houston, Texas

MICHAEL A. PFALLER
Departments of Pathology and Epidemiology (Emeritus), University of Iowa, Iowa City, and JMI Laboratories, North Liberty, Iowa

ALLAN PILLAY
Molecular Surveillance of T. pallidum Unit, Laboratory Reference and Research Branch, Division of STD Prevention, Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, Georgia

BENJAMIN A. PINSKY
Departments of Pathology and Medicine, Stanford University School of Medicine, Stanford, California

JOHANN PITOUT
Department of Pathology and Laboratory Medicine, University of Calgary, and Division of Microbiology, Calgary Laboratory Services, Calgary, Alberta, Canada

BOBBI S. PRITT
Laboratory Medicine and Pathology, Mayo Clinic, Rochester, Minnesota

GARY W. PROCOP
Department of Laboratory Medicine, Pathology and Laboratory Medicine Institute, Cleveland Clinic, Cleveland, Ohio

ELISABETH PUCHHAMMER-STÖCKL
Center for Virology, Medical University of Vienna, Vienna, Austria

JUSTIN D. RADOLF
Departments of Medicine, Pediatrics, Immunology, Molecular Biology and Biophysics, and Genetics and Genome Sciences, UConn Health, Farmington, Connecticut

M. ALI RAI
Cincinnati Veterans Affairs Medical Center, Cincinnati, Ohio

RYAN F. RELICH
Department of Pathology and Laboratory Medicine, Indiana University School of Medicine, Indianapolis, Indiana

L. BARTH RELLER
Departments of Pathology and Medicine, Duke University School of Medicine, Durham, North Carolina

DANIEL D. RHOADS
Case Western Reserve University, Cleveland, Ohio

ELVIRA RICHTER
MVZ Labor Dr. Limbach, TB Laboratory, Heidelberg, Germany

SANDRA S. RICHTER
Clinical Pathology, Cleveland Clinic, Cleveland, Ohio

WINNIE RIDDERBERG
Qiagen Bioinformatics, Aarhus, Denmark

PIERRE E. ROLLIN
Viral Special Pathogens Branch, Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, Georgia

JOSÉ R. ROMERO
Section of Pediatric Infectious Diseases, University of Arkansas for Medical Sciences and Arkansas Children's Hospital, Little Rock, Arkansas

PAUL A. ROTA
National Center for Immunization and Respiratory Diseases, Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, Georgia

KATHRYN L. RUOFF
O'Toole Lab, Department of Microbiology and Immunology, Geisel School of Medicine at Dartmouth, Hanover, New Hampshire

NORBERT RYAN
Bacteriology Laboratory, Victorian Infectious Diseases Reference Laboratory, The Peter Doherty Institute for Infection and Immunity, 792 Elizabeth St., Melbourne 3000, Australia

JIRI G. SAFAR
Case Western Reserve University, Cleveland, Ohio

MAX SALFINGER
Advanced Diagnostic Laboratories, National Jewish Health, Department of Medicine & Mycobacteriology Laboratory, Denver, Colorado

LINOJ SAMUEL
Clinical Microbiology, Henry Ford Health System, Detroit, Michigan

CARLOS A. Q. SANTOS
Division of Infectious Diseases, Rush University Medical Center, Chicago, Illinois

P. S. SATHESHKUMAR
Poxvirus and Rabies Branch, Division of High Consequence Pathogens and Pathologies, Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, Georgia

JULIUS SCHACHTER
Department of Laboratory Medicine, University of California, San Francisco, San Francisco, California

AUDREY N. SCHUETZ
Division of Clinical Microbiology, Department of Laboratory Medicine and Pathology, Mayo Clinic, Rochester, Minnesota

W. EVAN SECOR
Division of Parasitic Diseases and Malaria, Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, Georgia

RUTH HALL SEDLAK
Veterinary Medicine Research and Development, Zoetis, Kalamazoo, Michigan

ARLENE C. SEÑA
Department of Medicine, Division of Infectious Diseases, University of North Carolina at Chapel Hill, Chapel Hill, and Durham County Department of Public Health, Durham, North Carolina

PARHAM SENDI
Institute for Infectious Diseases, University of Bern, Bern, and Department of Infectious Diseases and Hospital Epidemiology, University Hospital Basel, University Basel, Basel, Switzerland

ROBERT W. SHAFER
Departments of Medicine and Pathology, Stanford University, Stanford, California

SUSAN E. SHARP
Kaiser Permanente, Department of Pathology, Portland, Oregon

ROSEMARY C. SHE
Department of Pathology, Keck School of Medicine of the University of Southern California, Los Angeles, California

HARSHA SHEOREY
Department of Microbiology, St Vincent's Hospital Melbourne, Fitzroy, Victoria 3065, Australia

PATRICIA LYNN SHEWMAKER
Streptococcus Laboratory, Respiratory Diseases Branch, Division of Bacterial Diseases, Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, Georgia

WUN-JU SHIEH
Infectious Diseases Pathology Branch, Division of High Consequence Pathogens and Pathology, National Center for Emerging and Zoonotic Infectious Diseases, Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, Georgia

ROBYN Y. SHIMIZU
UCLA HealthSystem, Pathology and Laboratory Medicine, Los Angeles, California

PATRICIA J. SIMNER
John Hopkins University School of Medicine, Pathology, Baltimore, Maryland

KAMALJIT SINGH
NorthShore University HealthSystem, Department of Pathology, Evanston, Illinois

ROBERT L. SKOV
MVZ Synlab Leverkusen GmbH, Leverkusen, Germany, and Statens Serum Institut, Copenhagen, Denmark

MAREK SMIEJA
Department of Pathology and Molecular Medicine, McMaster University, Hamilton, Ontario, Canada

JAMES W. SNYDER
University of Louisville, Department of Pathology and Laboratory Medicine, ULH, Louisville, Kentucky

TANIA C. SORRELL
Westmead Hospital, Infectious Diseases, Westmead, NSW 2145, Australia

BARBARA SPELLERBERG
Institute of Medical Microbiology and Hygiene, University of Ulm, Ulm, Germany

JENNIFER K. SPINLER
Department of Pathology & Immunology, Baylor College of Medicine, and Department of Pathology, Texas Children's Hospital, Houston, Texas

GEROLD STANEK
Medical University of Vienna, Center for Pathophysiology, Infectiology and Immunology, Institute for Hygiene and Applied Immunology, Vienna, Austria

KATHLEEN A. STELLRECHT
Department of Pathology and Laboratory Medicine, Albany Medical College and Albany Medical Center Hospital, Albany, New York

GREGORY A. STORCH
Department of Pediatrics, Washington University School of Medicine, St. Louis, Missouri

RICHARD C. SUMMERBELL
Sporometrics Inc. and Dalla Lana School of Public Health, University of Toronto, Toronto, Ontario, Canada

DEANNA A. SUTTON
Department of Pathology, University of Texas Health Science Center at San Antonio, San Antonio, Texas

WILLIAM M. SWITZER
Division of HIV/AIDS Prevention, National Center for HIV/AIDS, Viral Hepatitis, STD, and TB Prevention, Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, Georgia

WENDY A. SZYMCZAK
Department of Pathology, Montefiore Medical Center and Albert Einstein College of Medicine, Bronx, New York

YI-WEI TANG
Department of Laboratory Medicine, Memorial Sloan Kettering Cancer Center, and Department of Pathology and Laboratory Medicine, Weill Medical College of Cornell University, New York, New York

JOANNA TANNOUS
University of Wisconsin-Madison, Medical Microbiology and Immunology, Madison, Wisconsin

CHERYL L. TARR
Enteric Diseases Laboratory Branch, Division of Foodborne, Waterborne and Environmental Diseases, Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, Georgia

LÚCIA MARTINS TEIXEIRA
Instituto de Microbiologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

SAM R. TELFORD III
Cummings School of Veterinary Medicine, Tufts University, North Grafton, Massachusetts

KATE E. TEMPLETON
Royal Infirmary of Edinburgh, Specialist Virology Centre, Dept. Laboratory Medicine, Edinburgh, Lothian EH16 4SA, United Kingdom

ELITZA S. THEEL
Department of Laboratory Medicine and Pathology, Division of Clinical Microbiology
Mayo Clinic, Rochester, Minnesota

GEORGE R. THOMPSON, III
Department of Internal Medicine, Division of Infectious Diseases, and Department of Medical Microbiology and Immunology, University of California - Davis, Davis, California

JONATHAN S. TOWNER
Viral Special Pathogens Branch, Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, Georgia

EIJA TREES
National Center for Emerging and Zoonotic Infectious Diseases, Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, Georgia

CHRISTINE Y. TURENNE
Clinical Microbiology, Shared Health (Diagnostic Services), and Department of Medical Microbiology & Infectious Diseases, University of Manitoba, Winnipeg, Manitoba, Canada

JOHN D. TURNIDGE
Adelaide Medical School, University of Adelaide, Adelaide, Australia

KERIN TYRRELL
Los Angeles, California

ELIZABETH R. UNGER
Chronic Viral Diseases Branch, National Center for Emerging and Zoonotic Diseases, Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, Georgia

ALEXANDRA VALSAMAKIS
Roche Molecular Systems, Pleasanton, California, and Division of Medical Microbiology, Department of Pathology, The Johns Hopkins Medical Institutions, Baltimore, Maryland

WENDY W. J. VAN DE SANDE
Erasmus MC, Department of Medical Microbiology and Infectious Diseases, Rotterdam, The Netherlands

PETER A. R. VANDAMME
Laboratorium voor Microbiologie, Faculteit Wetenschappen, Universiteit Gent, Ghent, Belgium

MARIO VANEECHOUTTE
Laboratory Bacteriology Research, Department of Microbiology, Immunology and Clinical Chemistry, Faculty of Medicine and Health Sciences, Ghent University, Ghent, Belgium

ALIDA C. M. VELOO
Department of Medical Microbiology and Infection Prevention, University of Groningen, University Medical Center Groningen, Groningen, The Netherlands

JAMES VERSALOVIC
Departments of Pathology & Immunology and Molecular Virology & Microbiology, Baylor College of Medicine, and Department of Pathology, Texas Children's Hospital, Houston, Texas

RAQUEL VILELA
Universidade Federal do Minas Gerais, Faculdade de Farmacia, Campus Pampulha, Belo Horizonte, Minas Gerais CEP: 31.270.901, Brazil

GOVINDA S. VISVESVARA
Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, Georgia (Retired)

ULRICH VOGEL
Institute of Hygiene and Microbiology, University of Wuerzburg, Wuerzburg, Germany

CHRISTOF von EIFF
University Hospital Münster, Institute of Medical Microbiology, Münster, Germany, and Pfizer Pharma GmbH, Berlin, Germany

KEN B. WAITES
Department of Pathology, Diagnostic Mycoplasma Laboratory, University of Alabama at Birmingham, Birmingham, Alabama

DAVID H. WALKER
Department of Pathology, Center for Biodefense and Emerging Infectious Diseases, University of Texas Medical Branch, Galveston, Texas

RICHARD J. WALLACE, JR.
The University of Texas Health Science Center at Tyler, Department of Microbiology, Tyler, Texas

DAVID W. WARNOCK
Atlanta, Georgia

DAVID M. WARSHAUER
Communicable Disease Division, Wisconsin State Laboratory of Hygiene, Madison, Wisconsin

RAINER WEBER
Division of Infectious Diseases and Hospital Epidemiology, University Hospital Zurich, University of Zurich, Zurich, Switzerland

MELVIN P. WEINSTEIN
Departments of Medicine and Pathology & Laboratory Medicine, Rutgers Robert Wood Johnson Medical School, New Brunswick, New Jersey

ANDREJ WEINTRAUB
Karolinska Institutet, Department of Laboratory Medicine, Division of Clinical Microbiology, Stockholm, Sweden

LOUIS M. WEISS
Albert Einstein College of Medicine, Pathology, Bronx, New York

PETER F. WELLER
Harvard Medical School and Division of Infectious Diseases and Allergy and Inflammation Division, Beth Israel Deaconess Medical Center, Boston, Massachusetts

NELE WELLINGHAUSEN
Medical Laboratory Ravensburg, Infection Serology, Ravensburg, Germany

NANCY L. WENGENACK
Division of Clinical Microbiology, Mayo Clinic, Rochester, Minnesota

MICHAEL L. WILSON
Department of Pathology and Laboratory Services, Denver Health Medical Center, Denver, and Department of Pathology, University of Colorado School of Medicine, Aurora, Colorado

FRANK G. WITEBSKY
Microbiology Service, Department of Laboratory Medicine, Warren G. Magnuson Clinical Center, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland (Retired)

GAIL L. WOODS
University of Arkansas for Medical Sciences and Arkansas Children's Hospital, Pathology, Little Rock, Arkansas

LIHUA XIAO
College of Veterinary Medicine, South China Agricultural University, Guangzhou, China

PAMELA A. YAGER
Poxvirus and Rabies Branch, Division of High Consequence Pathogens and Pathologies, Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, Georgia

REINHARD ZBINDEN
Institute of Medical Microbiology, University of Zurich, Zurich, Switzerland

SEAN X. ZHANG
Division of Medical Microbiology, Department of Pathology, The Johns Hopkins Hospital, The Johns Hopkins School of Medicine, Baltimore, Maryland

译者前言

非常荣幸，我和百位同仁再次与中华医学电子音像出版社合作，对最新的美国第12版《临床微生物学手册》进行翻译和出版工作。

《临床微生物学手册》第11版中译本自出版以来，得到了国内临床微生物学检验同仁、临床医生、医学微生物专家、医学生、医药企业、美国微生物学会等各方的持续好评。大家一致认为，第11版中译本为国内广大同仁及从业者提供了巨大的帮助！这也是出版社和我们译者团队在短时间内重启该书最新版本翻译工作的强大动力。当然，第11版中译本也有些遗憾，如未列中文索引及一些细节错误等。第12版的翻译为我们提供了再一次学习和思考的机会，同时也弥补了上一版翻译时的遗憾和缺陷。真诚希望得到大家的进一步反馈、批评和建议。

第12版《临床微生物学手册》的翻译和编校工作历时1年，恰逢中国新型冠状病毒肺炎（简称新冠肺炎）疫情抗疫最艰难的时刻，很多译者奋战在抗疫一线。他们选择了无畏、逆行出征、白衣执甲。这精神激励着整个译者团队以更加顽强的意志、严谨的态度、满腔的激情认真推敲每一章、每一节、每一个新出现的名词。新冠肺炎疫情深刻地影响着我们，影响着世界，也影响着未来。但我们相信危机和机遇并存，诚如第12版《临床微生物学手册》的英文版主编所言：这是微生物学充满活力与动能的时代。我也相信国内临床微生物学同仁一方面是基于内在思考的逻辑深化，另一方面，也应因外部疫情的持续冲击，对微生物学将有更加深刻的体会与把握。在翻译、出版的过程中，我们的视野和理解与新一版的文字内容形成了富于建设性的碰撞，这碰撞的火花对推动我国临床微生物学的深入发展会有所助益！

再一次向美国微生物学会（ASM）出版社、中华医学电子音像出版社、多个学术团体（中华医学会检验医学分会微生物学组、中华医学会微生物学和免疫学分会微生物学组、中国医疗保健国际交流促进会临床微生物与感染分会等）、编辑、译者、读者致谢！

大家共同学习第12版《临床微生物学手册》，共同推动中国临床微生物学的发展！再次向持续奋战在抗疫一线的白衣战士们致以崇高的敬意！

北京大学人民医院　王辉

二零二一年一月于北京

原著前言

《临床微生物学手册》(以下简称手册)是临床微生物学领域最权威的参考文献。这一版手册受益于写作团队(22位编委和300位以上作者)的整体智慧,并得到美国微生物学会出版社(ASM Press)卓富能力的出版团队的支持。本版手册是第12版,是第11版手册出版后经过4年出版周期的再版。所有编委都是美国微生物学会资深成员,是ASM出版社出版工作的强有力的支持者。我们继承了上一版手册编委和作者的计划思路,在满足《临床微生物学手册》读者预期的情况下,最大限度地保证该书的质量和时效性。很明显,本手册由我们两位共同主编是一明智之举。本手册的容量和视野,需要我们分工合作,以确保编辑过程的深度和速度。我们希望本手册的读者认识到,每一位编写者的卓越都与本手册息息相关。

在本手册50年历史上,我们是第六位和第七位主编。我们很荣幸可以追随前任的书籍范例,也很荣幸地获得前任主编Patrick Murray、James Versalovic和James Jorgensen的睿智建议。我们对ASM出版社资深编辑Ellie Tupper表示由衷的敬意,他在推动整个编辑出版过程中表现出了平稳的把控力。

这是临床微生物学充满活力与动能的时代。新技术(质谱、一代、二代、三代与下一代测序和其他分子生物学方法)深刻地影响了我们对微生物的检测、鉴定理念。本手册继续容纳经典的微生物学技术,如基础性的显微镜、培养,也包括上面提及的新方法。近来,一些微生物成为疾病的重要病因,这些微生物包括埃博拉病毒、寨卡病毒、肠病毒D-68、产碳青霉烯酶的革兰阴性杆菌、多重耐药的真菌如耳念珠菌和多育节荚孢霉(Lomentospora prolificans)。本手册竭尽所能地涵盖了近来这些新发病原的最新信息。同样,分子分类的进步导致了细菌、真菌和原生寄生虫属和种命名的重要变化,这些也都体现在本手册中。而且,人类微生物组的持续研究更新了我们对正常微生物群落的理解,这些研究也提出了混合感染而非单一病原感染的可能性。

总之,对于参与并引领第12版手册的编辑出版,我们深表荣幸。我们希望本手册编辑委员会和作者们的努力能持续为临床微生物学相关群体提供有益的帮助。

KAREN C. CARROLL
MICHAEL A. PFALLER
王辉　译;陈民钧　审校

目　录

— 第一卷 —

第一部分　诊断策略和一般性问题

第二部分　细菌学

第二卷

第四部分 病 毒

第五部分 抗病毒药物和敏感性试验方法

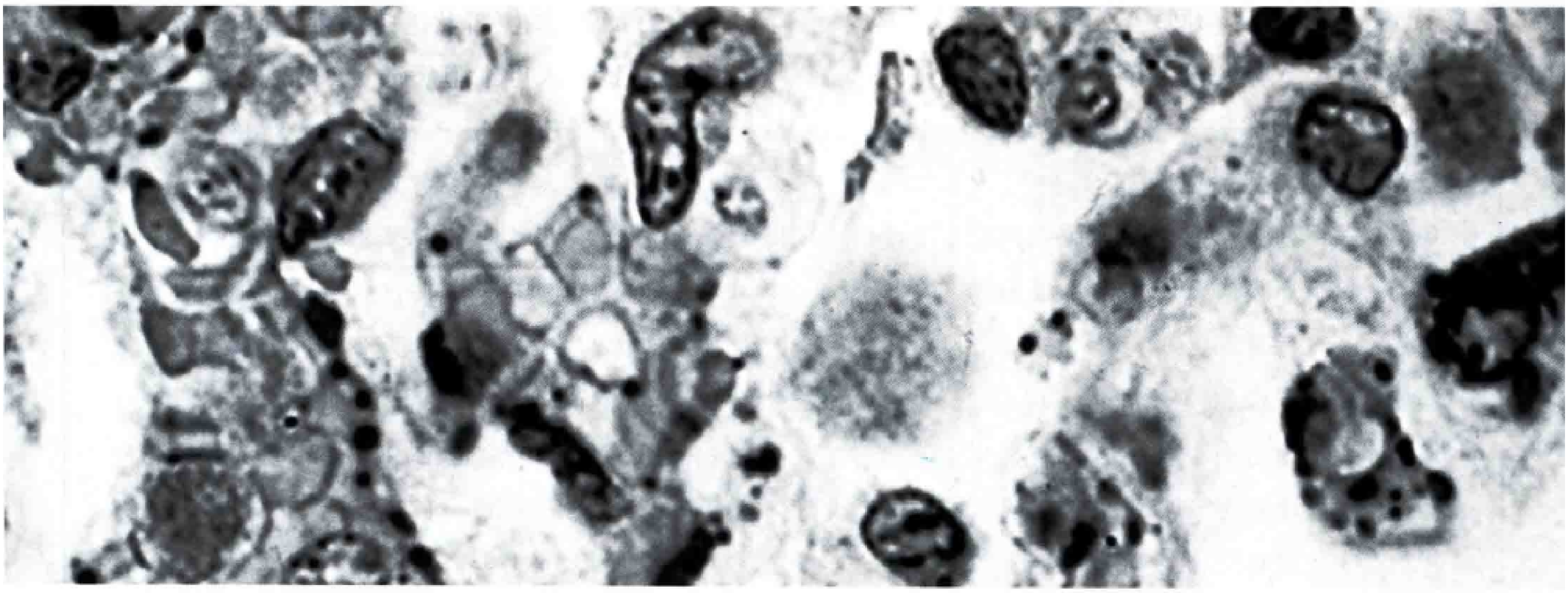
第六部分 真 菌 学

第七部分 抗真菌药物和敏感性试验方法

第八部分 寄生虫学

第九部分 抗寄生虫药物和敏感性试验方法

第四部分 病 毒



第10篇

总　论

第80章 病毒的分类和命名

ELLIOT J. LEFKOWITZ

（王利君 译；邹明祥、曹彬 审校）

一、引言

（一）分类学

从本质上讲，分类学是一门对物体进行分类和命名的科学。数百年来，人们一直是根据林奈系统（Linnaean system）将有生命的物体进行归类[1]，这个系统的分类方案是把有生命的物体根据其共有的特点归入不同的种（species），再根据相互关系依次归到更高一层的类群[从属（genera）到科（families）、目（orders）、纲（classes）、门（phyla）、界（kingdoms）、域（domains），包括了很多现在发现的中间等级（intervening ranks）]。最初的生物分类是根据肉眼可见的生物体之间组织结构的相似性，现在还包括了分子和遗传信息。

分类学的功能不只是分门别类。通常将一些在分类上密切相关的生物体的已有知识扩展到同一群（group）中生物学信息所知较少的生物体。对于病毒来讲，这种对比分析在增进人们全面了解那些鲜为人知或新分离病毒的分子生物学、致病机制、流行病学和进化特征方面发挥了至关重要的作用。这些知识有助于研发诊断技术、疫苗和抗病毒治疗，增强人们应对新发病毒威胁的能力。

（二）病毒

病毒不易在生物进化树上进行定位[2-4]。无论是用进化树主干枝的延伸侧枝，还是将其本身作为单独的从主干基底部伸出的枝干都不能非常准确地描述它们。事实上，病毒像是一群有多重但又各自独立不相干的进化源头的生物[5-7]，它们的进化不容易，或者说不能完全从其宿主的进化系统中分离，因为病毒不能脱离宿主进行自主复制或进化[8-9]。实际上，宿主代表了病毒最重要的特征之一，以至于在病毒的分类时必须考虑宿主因素。因此，在分类学上将病毒描述为进化树四处延伸之侧枝上一个个独立的嫩枝更为得当。

除了进化史的不同，病毒还在编码分子的多样性上与其他域生命不同，它们利用这些编码分子来储存自己的遗传程序[10-11]。病毒以外其他域的生命都将双链DNA（double-stranded DNA，dsDNA）作为基因遗传程序的基本储存体，病毒则不然，它的基因组可以是dsDNA、单链DNA（single-stranded DNA，ssDNA）、dsRNA或ssRNA（依据mRNA的编码链，可以分为正链或负链RNA）。另外，逆转录可能是病毒的分子程序的一个部分。不同的病毒，其基因组的局部结构也不同，可以是线型、环状、单一节段或多节段。病毒的分类和命名需综合考虑全部病毒特性和大量其他标准。

二、病毒分类学

病毒的ICTV分类

分类学工作由许多国际公认的权威组织负责进行，这些组织通过制定对每一种生物的域或亚域（subdomains）的分类规则、方法和命名过程来指导和监督分类进程[12-14]。对于病毒，微生物学会国际联盟中的病毒学分部（the Virology Division of the International Union of Microbiological Societies）指导下的国际病毒分类委员会（International Committee on Taxonomy of Viruses，ICTV）承担发展、细化和维护全球通用的病毒分类的任务[15-17]。

ICTV当前认可了用5个层级制定全球通用

的病毒分类：目（order）、科（family）、亚科（subfamily）、属（genus）和种（species）。2016 年的 ICTV 病毒分类学[18]包括 8 个目、122 个科、35 个亚科、735 个属和 4404 个种。正式的病毒分类发表在 ICTV 的网站上（http://ictv.global）及 ICTV 的报告中[16]。第一个 ICTV 分类报告是源于 1968 年国际病毒学大会（赫尔辛基）和会后审定的内容[19]。之后的报告是由众多的病毒学家合作共同撰写、定期发表，最近的书面报告是发表于 2012 年的第 9 版。当前的报告（第 10 版）是一份在线、开放源码的出版物，将不断发布关于每个病毒家族更新的章节（http://ictv.global/report/）。这些报告提供了分层类群的形成、术语的定义、正式的分类命名及更高一层类群的描述（higher-level taxa）中大家的各种努力和逻辑推断的历史经过。

一开始，ICTV 仅认可"属"（genus）和对"属"以上的层次进行分类，1991 年向下分到了"种（species）"这一层次[20]。对于一个病毒，"种"的定义是经 ICTV 批准的分类分层中最低的层次。"种"是指"一个单元（monophyletic）中的一组病毒，可以通过多种标准把它们和其他种的病毒区分开"[21]。一般来讲，每一个"种"是一个"属"中的一个成员，换句话说，也是一个"科（family）"中的一个成员；有少数的"科"亦是近来认可的 8 个"目（order）"中的一个，但是绝大多数病毒的"科"不属于任何一个"目"。一些"种"尚未归类于任何一个"属"（但可能归类于一个"科"），少数的"属"尚未能归类于任何一个"科"，需要积累更多的生物学信息才能对这些病毒明确分类。"亚科（subfamily）"和"目（order）"并非必要，因此，这 2 项在病毒的完整的分类分层中并非必需。

ICTV 受一系列的章程管理，遵照病毒分类和命名的国际代码（the International Code of Virus Classification and Nomenclature）[16,18,21-22]的规则和定义对病毒进行分类和命名。任何对正式 ICTV 分类和命名的修改或增添，以及对于章程和代码的修改，必须经过 ICTV 相关成员的投票通过。任何个人都可以向 ICTV 提交关于修改现有的类群分层（taxa）或者创建一个新的类群分层的建议。

除了规定病毒分类的过程和规则，ICTV 代码还规定了必须遵循的病毒命名规则。根据分层的层次，高一级类群的分类分层，名称后用一个后缀来表示。后缀"*-virales*"代表目（order）；后缀"*-viridae*"代表科（family）；后缀"*-virinae*"代表亚科（subfamily）；后缀"*-virus*"代表属（genus）。"种（species）"的名称应该尽可能简洁，但是一般含 2 个或以上的词，通常一个种的名称会以"*virus*"结尾，或者以" *virus*"作为后缀，但并不是必须的。在书写时，类群分层类别的名称用斜体字，且名称的第一个字母用大写（作为"种"的名称的一部分，任何专有名词的第一个字母，例如，地域名称/地理位置，也要用大写字母）。在一些特殊的情况下，有时很难确定一个"种"的名称是否用正式的斜体字，因为有些"种"的名称和常用的病毒名是重合的。类或群（taxa）是个抽象的概念，并不是实体的存在，举例来说，天花病毒种（the species *Variolavirus*）属于正痘病毒属（the genus *Orthopoxvirus*）痘病毒科（the family *Poxviridae*），这些名称属于分层的抽象概念，因此，书面体要用正式的斜体字；而当人们说天花病毒（variola virus）这个引起天花（smallpox）的实体时，病毒名称既不用大写，也不用斜体。

尽管许多已经被分到了"种"的病毒分离株可以根据基因系统发育、免疫学反应性或者其他特征再进一步分类，ICTV 仅关注"种"及"种"以上层次级别的分类。在很多情况下，这种"亚种层次（subspecies-level）"的分类是某一个研究者根据一些特定的基础来分类并在学术杂志上发表文章。在另外一些情况下，更有组织地根据一些特定的标准把某一个"种（species）"进一步分成一系列的"型（types）"，这种"亚种（subspecies）"水平分类的病毒的例子有丙型肝炎病毒（hepatitis C virus）[23]、登革病毒（dengue virus）[24]和人类免疫缺陷病毒（HIV）[25]。

三、分类学分类的标准

（一）以特征为基础的描述

分类学的分类过程是通过对任何一个特定门类的物体的特征进行比较和对比给出定义来完成的。病毒的生物学的任何一方面都可以通过一组特征来给出定义。这些特征在定量描述时会很有价值，如对病毒颗粒顶端三角型（triangulation，T）的数量的表示可以描述 20 面体的病毒体的衣壳结构；或者是单纯的定性描述，如病毒体是否带有

来自宿主细胞的脂包膜。

病毒的描述是通过选择一组适当的特征并赋值来描述[26-27]。表 80-1 总结了可用于分类的一些主要特征,以及每个类别的示例。许多特征有多个值,其可能与任何一个病毒分类群或病毒株相关联。例如,用毒株分离的地点和时间来描述特定的病毒株,病毒株就与适应的值(如国家、年份)相关联。描述特定病毒"种"的特征,可包括其宿主范围,以及一系列同"种"病毒相关的疾病。

表 80-1 用于分类学的分类特征

主要分类类别	特征举例
名称	病毒名称、分离株名称、同义词
分离株信息	地点、日期、宿主、组织、分离方法、序列号
病毒体特征	形态学(大小、包膜、衣壳)、理化和物理性质、核酸(基因组类型、大小及结构)、蛋白
基因组组成和复制	吸附、穿入、转录、翻译、蛋白合成、基因组复制、组装
生物学特征	宿主范围、传播、地理分布、疾病、病理
抗原性	抗原决定簇、表位、血清学关系、免疫、变异、诊断、疫苗

没有一个主要的特征列表(master character list)被 ICTV 用于病毒分类,这是因为每一个类群(taxon)都是独特的,对描述某一个类群有用的一些特征用到另外一个类群可能就完全不适合。表 80-1 在某种意义上可能是有用的,那就是作为一个含有潜在特征的列表用来进行任何一个特定的分类,但后续还需要进行关键性的研究来选择和确定最合适的一组特征。分类特征的选择和评估只有具有相关专业知识的专家才能完成。因此,负责病毒分类的 ICTV 研究专家组成员都是相应病毒领域的专家,由他们根据自己专业领域的专长来制订每个病毒归类分科的规则[16, 28-29]。

分类学的分类规则是由一组界限分明的标准(划界标准)所定义,这些标准对分类分层的任何一个等级都是特异的。这些标准可以被研究人员用来确定他们新分离到的一个病毒株是属于一个现已存在的种(因此,无须进一步分类),或者当他们分离到的病毒株根据这些划界标准与现存在的已有种系的差别足够大而提示了一个新的种的发现时,他们要向相关的研究团体提交建议,说明发现了一个新的种(或者更高分类层次)。在 ICTV 报告的每一章中都提供了可以描述任何一个特定的分类单位的划界标准。表 80-2 以肠道病毒 C(enterovirusC)[脊髓灰质炎病毒(polioviruses)

表 80-2 分类学分类的标准

目:小 RNA 病毒目
- 病毒体
  - 无包膜、二十面体对称的颗粒,直径约 30 nm
  - 衣壳蛋白包括 3 个不同的 jelly-roll 结构域形成的颗粒,pseudo-T=3 对称
- 基因组
  - 正链 ssRNA
  - 1 个或 2 个单顺反子基因组片段
  - 5′端结合 VPg 蛋白
  - 基因组本身作为 mRNA
  - 基因组包含典型的 3′端 polyA 尾
- 蛋白质
  - 1 个或多个由病毒编码的蛋白酶将最初翻译的多聚蛋白剪切为成熟的蛋白质
  - 功能域包括一个Ⅲ型超家族(superfamily)解旋酶(Hel);胰凝乳蛋白酶样蛋白酶(Pro);和一个Ⅰ型超家族 RNA-依赖的 RNA 多聚酶(Pol)
  - 非结构蛋白排列为 Hel-VPg-Pro-Pol

科:小 RNA 病毒科
- 基因组
  - 单股单顺反子基因组片段
- 蛋白质
  - 保守的基因组结构
  - 保守的成熟功能蛋白
- 蛋白序列保守(蛋白酶—多聚酶区)

属:肠道病毒属
- 蛋白质
  - 整个多聚蛋白的氨基酸一致性至少大于 50%
  - VPg 序列保守
  - 缺少一个 L 蛋白
  - 具有 1 型内部核糖体进入位点
- 宿主
  - 病毒主要在胃肠道复制(但不仅限于胃肠道)

种:肠道病毒 C 组
- 宿主
  - 共享有限范围的宿主细胞受体
  - 共享有限范围的自然宿主(如人类)
- 基因组
  - 保守的基因组图谱(蛋白功能域组成)
  - 相同的多聚蛋白的蛋白酶加工程序
  - 在蛋白酶加工、复制、衣壳化和基因重组的方式等方面有很高的兼容性
- 序列相似性
  - 氨基酸一致性:多聚蛋白为 70%
  - 氨基酸一致性:结构蛋白 P1 为 60%
  - 氨基酸一致性:非结构蛋白 2C 和 3CD 为 70%
  - 相似的 G+C 含量(在 2.5%以内)

种系发生
- 单系

2008年被重新分类为这个种]为例，提供了用以定义一个种(species)，以及它的上一级分类单位的一些特异性标准[16,29]。在分类时，每一个层次都有不同组合的特征，可用于决定这个病毒分到哪一层(与特征相当的层次或低于该层次)。在目(order)、科(family)和属(genus)的层次，特征是通用的(universal)，在这些层次的所有的病毒必须具备这些特征，而在种(species)这一层次中，其特征并不一定为所有这些种的病毒成员所具有。

(二)以序列为基础的特征

病毒形态学和结构的特征一直是重要的分类标准。随着基因组测序技术的出现，以基因序列为基础的比较分析在分类中的重要作用日渐增强。表80-2提供了每一个分类等级中以序列为基础的不同标准，这些标准可用来制定处于该层次中成员的重要特征。在所有的小RNA病毒目(order *Picornavirales*)中存在保守的功能性氨基酸域。保守的蛋白酶和多聚酶蛋白序列可以帮助定义科(family)。如将一个病毒归于肠道病毒属(*Enterovirus* genus)需要有一个跨过整个多蛋白的特异的氨基酸保守区，同属一个种(species)的病毒成员需要有更高的基因序列的一致性。基于基因序列比较的分类是目前所有病毒分层分类的主要决定特征之一。如何进行序列的比较，如何进行相关性的测定，到什么样的程度可以列入同一层次类群单位的划界标准，这些在不同的类群之间存在很大的差别。对于不同病毒之间内在的多变性是可以理解的，尤其是对于那些基因组构成不同的病毒之间。例如，具有dsDNA基因组的病毒在序列水平的变异远小于RNA病毒，这种不同是DNA和RNA多聚酶错误率不同的直接后果[5]。因此，由每一个ICTV研究小组确定的用来定义特异的以序列为基础的划界标准的测定方法对每一个分层单位也会各有不同。

以序列为基础的比较可以采用各种各样不同的技术来实现。最基本的是配对序列比较(pairwise sequence comparison)，即将2个要比较的序列对齐，计算2个序列在相同位置的核苷酸或者氨基酸的不相同的数目。当需要比较多个序列时，可以制作距离表，以展示组内每对可能的对比序列的相似百分数(the percent similarity)。根据所研究的特定的分类层次，用于比对和比较的核苷酸和氨基酸的范围可以是完整的病毒基因组、病毒基因组的一部分，或者是单个的基因。通过检查序列距离表，研究组可以设定将病毒进行分层归类的特定的相似性水平的划界标准。

另外，也可以选用更加复杂的基于序列配对比较的分析方法以获得直观的差异性、选择临界值(cutoffs)和设定基因的归属安排(making assignments)。近些年采用的一种方法是序列保守性的配对分析(the pairwise analysis of sequence conservation，PASC)[30-31]。PASC可以用完整基因组的核苷酸序列的配对分析，也可以做单个基因的核苷酸或氨基酸序列配对分析。每一对已知序列间均可以进行配对比对。所有的配对比对完成后，计算每一对比较序列之间的一致性的百分率，然后结合比对的数目做图，以呈现配对的相似性。图80-1a提供了一个PASC图的例子，这是用属于痘病毒科(the family *Poxviridae*)的所有病毒分离株的DNA多聚酶基因的氨基酸配对比对建成[32]。图中产生了数个明显不同的峰，每个峰相当于痘病毒科某一个特定分类分层的病毒之间的配对比较。最低的一致性(20%～30%)来自不同的亚科(subfamilies)的病毒之间的比较，而属(genus)水平的比较呈现了多个峰，一致性为45%～75%。不同种之间(interspecies)比较峰的一致性为80%～98%，最突出的种间比较峰的一致性为97%～98%。种内的比较(intraspecies comparisons)，即属于同一个种的不同病毒株之间的比较，显示出非常高的一致性(99%甚至更高)。图80-1b显示了痘病毒科病毒株的分类层次是如何在基因进化树中排列的。通过运用PASC，可以将一个新分离到的病毒株与所有已知的病毒株进行比较，通过测算，根据与所有已知的病毒株的相似性的比较，可以判断此新分离到的毒株是归类于已有的分类层次，还是提示为一个新的分类层次的病毒株。有意思的是，从生物学角度来看，PASC图中峰型可显示出明显的保守模式，其提示所选择的蛋白序列适应于分析所研究的蛋白质的进化史(在此特指痘病毒DNA多聚酶)。现在PASC分析已被很多ICTV研究组用于分类工作[31,33-34]。

最后一个被广泛用于分类划界标准的以序列为基础的研究是系统进化分析(phylogenetic analysis)[29,35]。系统进化分析使用由完整或部分的基因组(核苷酸)、完整或部分的蛋白质(氨基酸)构

建成的多序列比对(由适当的研究组对任何一个类群分类提供准确的参数)。这个多序列比对作为以后系统进化分析研究的基准,在应用其他各种可能的方法对某病毒株的遗传进化过程进行分析推断时,以这个多序列比对为基准,其显示的结果就是基因进化树。树的枝杈显示的是一个个病毒株的遗传进化史,枝干的长度相当于进化变化的数量,这些变化产生于树的每个枝节之中(中间的或者是终端的)。图 80-1b 是一棵基因进化树,展示了痘病毒科(*Poxviridae*)的亚科(subfamilies)和属(genera)的分支结构细节和距离。在这个分层水平,不可能看到任何一个属(genera)以下的种(species)的分支结构细节,但如果将正痘病毒属(genus *Orthopoxvirus*)下的种(species)单独拿出来进行比较,就可以看到种(species)这一层的排列(图80-1c)[32]。用类似于PASC分析法,一个新的

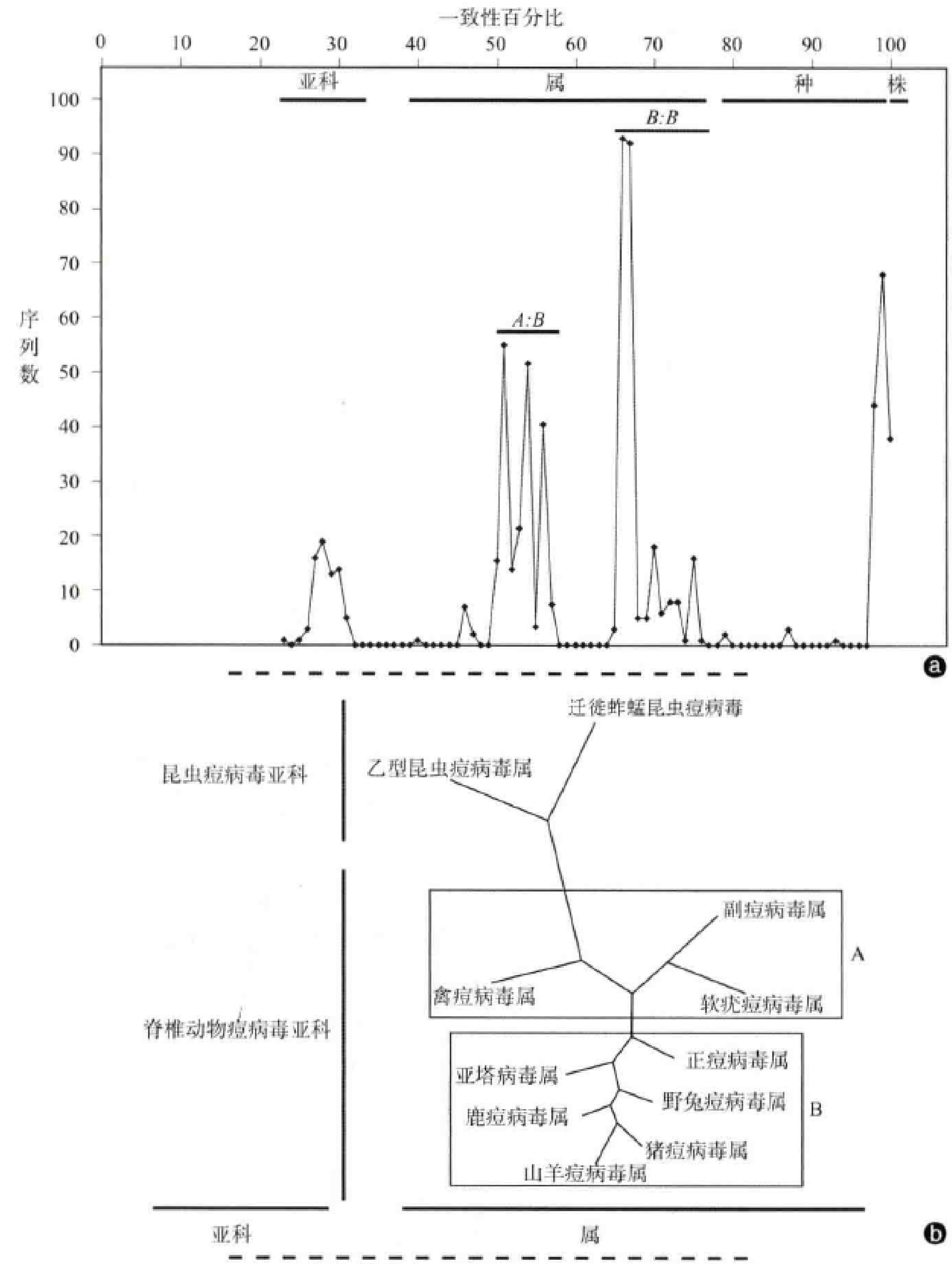


图 80-1 通过序列相似性的分类学划界

注:a. 每一个基因组序列完整的痘病毒(poxvirus)的依赖 DNA 的 DNA 多聚酶基因(痘病毒 E9L 基因同源)进行 PASC 分析。每一个蛋白序列都进行比对,每个比对的一致性百分比值作直方图。直方图包括所有可以比对的数据。根据每一对配对序列比较所表现出来的类群分层,峰值就可以在图的顶端确定。b. 基于痘病毒科病毒 DNA 多聚酶蛋白序列的系统发育重建。亚科和属的界限被确认。末端节点按属名标注。图中,A 组与 B 组属间的序列比对,以及 B 组属内的序列比对峰值与图 a 中一致(A∶B,B∶B)

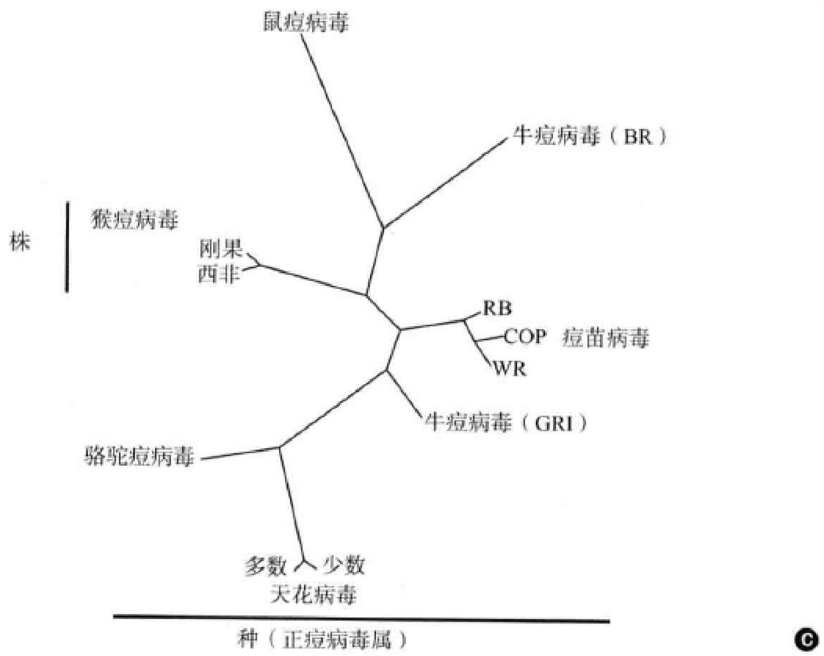


图 80-1(续)

c. 根据对每一个代表性的正痘病毒种或病毒株的多个核心基因组区域核苷酸序列的比对进行的系统发育预测。BR. Brighton Red 株；GRI. GRI-90 株；本图来源于 Virus Research[32]，已获得出版商许可，并做了改进

病毒的基因进化位置可以跟基因进化树上已经存在的任何一个病毒株进行比较以确定这个新病毒的分类分层。仔细观察图 80-1c，可以发现种(species)之间的分化和区别[如猴痘病毒(*Monkeypox virus*)和鼠痘病毒(*Ectromelia virus*)]，以及清楚的区分同一种内不同病毒分离株[如刚果猴痘病毒和西非猴痘病毒进化枝(the Congo and West African monkeypox virus clades)]。

四、人类病原体的分类学

感染人类的病毒归属于 5 个目(orders)：布尼亚病毒目(*Bunyavirales*)、疱疹病毒目(*Herpesvirales*)、单负链病毒目(*Mononegavirales*)、套式病毒目(*Nidovirales*)及小 RNA 病毒目(*Picornavirales*)[11, 16, 36][其他现已存在的目，如尾病毒目(*Caudovirales*)、*Ligamenvirales* 和芜菁黄花叶病毒目(*Tymovirales*)，分别只包括噬菌体、古生菌病毒和植物病毒]。人类病原体被进一步分为 31 个科(families)(并非所有的科隶属于同一个目)、11 个亚科(subfamilies)、81 个属(genera)(每个属常包括多个种)。表 80-3 提供了人类病原体分类分层的概况，包括每一个属下面一些代表性的种。此表中的信息是根据文献[11, 36]和提交给 ICTV 的分类建议(https://talk.ictvonline.org/files/ictv_official_taxonomy_updates_since_the_8th_report/)编制的。表 80-4 列举了几个用来定义每个病毒科(family)的病毒的结构特征。最后，图 80-2 显示了每个科的病毒体的形态模式。

表 80-3 感染人类的病毒分类

目	科	亚科	属	种(ICTV 模式种或常见范例)
dsDNA，线性[a]				
疱疹病毒目	疱疹病毒科	甲型疱疹病毒亚科	单纯疱疹病毒属	人疱疹病毒 1 型[b](单纯疱疹病毒 1 型)、人疱疹病毒 2 型[b](单纯疱疹病毒 2 型)、恒河猴疱疹病毒 1 型[b](B 病毒)
			水痘病毒属	人α疱疹病毒 3 型[b](水痘-带状疱疹病毒)
		乙型疱疹病毒亚科	巨细胞病毒属	人β疱疹病毒 5 型[b](人巨细胞病毒)

（续 表）

目	科	亚科	属	种(ICTV 模式种或常见范例)
			玫瑰疹病毒属	人β疱疹病毒 6A[b]、6B[b] 和 7 型[b]
		丙型疱疹病毒亚科	淋巴隐病毒属	人γ疱疹病毒 4 型[b](EB 病毒)
			蛛猴疱疹病毒属	人γ疱疹病毒 8 型[b](卡波西肉瘤相关疱疹病毒)
未归类	腺病毒科		哺乳动物腺病毒属	人哺乳动物腺病毒 A[b] 至 G 组[b]
未归类	痘病毒科	脊椎动物痘病毒亚科	软疣痘病毒属	传染性软疣病毒
			正痘病毒属	牛痘病毒、猴痘病毒、痘苗病毒、天花病毒
			副痘病毒属	口疮病毒
			亚塔痘病毒属	亚巴猴肿瘤病毒
dsDNA，环状				
未归类	乳头瘤病毒科[c]		甲型乳头瘤病毒属	甲型乳头瘤病毒 1 型(人乳头瘤病毒 32 型)
			乙型乳头瘤病毒属	乙型乳头瘤病毒 1 型(人乳头瘤病毒 5 型)
			丙型乳头瘤病毒属	丙型乳头瘤病毒 1 型(人乳头瘤病毒 4 型)
			丑型乳头瘤病毒属	丑型乳头瘤病毒 1 型(人乳头瘤病毒 1 型)
			寅型乳头瘤病毒属	寅型乳头瘤病毒 1 型(人乳头瘤病毒 41 型)
未归类	多瘤病毒科		甲型多瘤病毒属[b]	人多瘤病毒 5[d]、8[d]、9[d]、12[d]、13[d] 型
			乙型多瘤病毒属[b]	人多瘤病毒 1[b](BK 多瘤病毒)、人多瘤病毒 2[b](JC 多瘤病毒)、人多瘤病毒 3[d]、4 型[d]
			丁型多瘤病毒属[b]	人多瘤病毒 6[d]、7[d]、10[d]、11 型[d]
ssDNA，线性				
未归类	细小病毒科	细小病毒亚科	博卡细小病毒属[b]	灵长动物博卡细小病毒 1 型[d](人博卡病毒 1 型)和 2 型[d](人博卡病毒 2a TU 型)
			依赖细小病毒属[b]	腺相关依赖细小病毒 A[b](腺相关病毒 1-4)和 B[b](腺相关病毒 5)
			红病毒属[b]	灵长动物红细小病毒 1 型[b](人细小病毒 B19)
			四细小病毒[b]	灵长动物四细小病毒 1 型[d](人细小病毒 4)
ssDNA，环状				
未归类	指环病毒科		甲型细环病毒属	细环病毒 1 型(TTV)
未归类	圆环病毒科		圆环病毒属[b]	人相关圆环病毒 1 型[d]
			Cyclovirus[b]	*Humanassociatedcyclovirus* 1-11(全部)[d]
未归类	*Genomoviridae*		*Gemygorvirus*[b]	*Sewagederived gemygorvirus* 1[d]
			Gemykibivirus[b]	*Humanassociated gemykibivirus* 1-5(全部)[d]
			Gemyvongvirus[b]	*Humanassociated gemyvongvirus* 1[d]
dsDNA，逆转录环状				
未归类	嗜肝病毒科		正嗜肝病毒属	乙型肝炎病毒
ssRNA，线性，正链				
套式病毒目	冠状病毒科	冠状病毒亚科	甲型冠状病毒属	人冠状病毒 229E、人冠状病毒 NL63
			乙型冠状病毒属	乙型冠状病毒 1 型、人冠状病毒 HKU1、中东呼吸综合征相关冠状病毒[d]、严重急性呼吸综合征相关冠状病毒
小 RNA 病毒目	小 RNA 病毒科	环曲病毒亚科	环曲病毒属	人环曲病毒
			口蹄疫病毒属	口蹄疫病毒
			心脏病毒属[b]	心脏病毒 B[d](塞弗病毒)

（续 表）

目	科	亚科	属	种(ICTV模式种或常见范例)
			Cosavirus[b]	*CosavirusB*[d]、*D*[d]、*E*[d]、*F*[d]（人 *Cosavirus* B1、D1、E1、F1）
			肠道病毒属	肠道病毒A组（人柯萨奇病毒A2、人肠道病毒71型）
				肠道病毒B组（人柯萨奇病毒B1、人埃可病毒）
				肠道病毒C组（人脊髓灰质炎病毒1-3型、人柯萨奇病毒A1）
				肠道病毒D组（人肠道病毒68、70和94型）
				鼻病毒A、B和C组
			肝炎病毒属	甲型肝炎病毒[b]
			库布病毒[b]	爱知病毒A[d]（爱知病毒）
			副肠孤病毒属	副肠孤病毒A[b]（人副肠孤病毒）
			Salivirus[b]	*Salivirus* A[d]（klassevirus）
未归类	星状病毒科		哺乳类星状病毒属	星状病毒1、6、8和9型（人星状病毒）
未归类	杯状病毒科		诺瓦克病毒属	诺瓦克病毒
			札幌病毒属	札幌病毒
未归类	黄病毒科		黄病毒属	登革病毒、日本脑炎病毒、科萨努尔森林病病毒、兰加特病毒、羊跳跃病病毒、墨累山谷脑炎病毒、鄂木斯克出血热病毒、波瓦桑病毒、圣路易斯脑炎病毒、蜱传脑炎病毒、维塞尔斯布朗病毒、西尼罗病毒、黄热病毒、寨卡病毒
			丙型肝炎属	丙型肝炎病毒
			庚型肝炎病毒属[b]	庚型肝炎病毒A[d]（GB病毒）、庚型肝炎病毒H[d]（人庚型肝炎病毒病毒2）
未归类	肝炎病毒科		正戊型肝炎病毒属	正戊型肝炎病毒A[b]（戊型肝炎病毒）
未归类	披膜病毒科		甲病毒属	*Barmah* 森林病毒、基孔肯雅病毒、东方马脑炎病毒、马亚罗病毒[d]、奥尼永尼永病毒、罗斯河病毒、塞姆利基森林病毒、辛德毕斯病毒、委内瑞拉马脑炎病毒、西方马脑炎病毒
			风疹病毒属	风疹病毒
ssRNA，线性，负链				
单负链病毒目	波纳病毒科		波纳病毒属	哺乳动物1波纳病毒[b]（波纳病病毒）、哺乳动物2波纳病毒[d]（班松鼠波纳病毒）
	丝状病毒科		埃博拉病毒属	本迪布焦埃博拉病毒、苏丹埃博拉病毒、邰林埃博拉病毒、扎伊尔埃博拉病毒
			马堡病毒属	马堡病毒
	副黏病毒科		亨尼病毒属	亨德拉病毒[b]、尼帕病毒[b]
			麻疹病毒属	麻疹病毒[b]
			呼吸道病毒属	人呼吸道病毒1[b]、3型[b]（人副流感病毒1型和3型）
			腮腺炎病毒属	人腮腺炎病毒2[b]、4型[b]（人副流感病毒2型和4型）、腮腺炎病毒[b]、*Sosuga* 风疹病毒[d]
	肺病毒科[b]		偏肺病毒属	人偏肺病毒
			肺病毒属[b]	人肺病毒[b]（人呼吸道合胞病毒）
	弹状病毒科		*Ledantevirus*[b]	*Le Dantec ledantevirus*[d]、*Nkolbisson ledantevirus*[d]
			狂犬病毒属	狂犬病毒[b]
			Tibrovirus[b]	*Bas-Congo tibrovirus*[d]、*Ekpoma* 1 *tibrovirus*[d]、*Ekpoma* 2 *tibrovirus*[d]
ssRNA环状，负链				
未归类	未归类		丁型肝炎病毒属	丁型肝炎病毒

（续 表）

目	科	亚科	属	种(ICTV 模式种或常见范例)
ssRNA，线性，负链，分节段				
未归类	正黏病毒科		甲型流感病毒属	甲型流感病毒
			乙型流感病毒属	乙型流感病毒
			丙型流感病毒属	丙型流感病毒
ssRNA 线性(非共价封闭)，负链或双义，分节段				
布尼亚病毒目[b]	汉坦病毒科[b]		正汉坦病毒属[b]	汉坦病毒[b]、普马拉病毒[b]、辛诺柏病毒[b]、缩塔帕拉亚姆病毒[b]，多个其他种
	内罗病毒科[b]		内罗病毒属[b]	克里米亚-刚果出血热病毒[b]、达格毕病毒[b]
	周布尼亚病毒科[b]		正布尼亚病毒属	布尼亚维拉病毒[b]、布旺巴病毒[b]、加利福尼亚脑炎病毒[b]、瓜马病毒[b]、马德里病毒[b]、林恩多病毒[b]、*Oropouche* 病毒[b]、塔卡厄马病毒[b]
	白纤病毒科[b]		白蛉热病毒属	庞塔托鲁病毒[b]、裂谷热病毒[b]、白蛉热那不勒斯病毒[b]、*SFTS phlebovirus*[d]
未归类	沙粒病毒科		哺乳动物沙粒病毒属[b]	恰巴雷病毒[b]、瓜纳瑞托病毒[b]、胡宁病毒[b]、拉沙病毒[b]、*Lujo* 病毒[b]、淋巴细胞性脉络丛脑膜炎病毒[b]、马丘坡病毒[b]、*Sabiá* 病毒[b]
dsRNA，线性，分节段				
未归类	小双 RNA 病毒科		小双 RNA 病毒属	人小双 RNA 病毒
未归类	呼肠孤病毒科	光滑呼肠孤病毒亚科	环状病毒属	昌吉诺拉病毒、科里帕塔病毒、大岛病毒、利庞博病毒、奥轮谷病毒
			轮状病毒属	轮状病毒 A、B 和 C 组；轮状病毒 H[d]
			东南亚十二 RNA 病毒属	班纳病毒
		刺突呼肠孤病毒亚科	科州蜱传热病毒属	科州蜱传热病毒
			正呼肠孤病毒属	哺乳动物正呼肠孤病毒
ssRNA，线性，双体，逆转录				
未归类	逆转录病毒科	正逆转录病毒亚科	丁型逆转录病毒属	灵长类 T 淋巴细胞白血病病毒 1 型和 2 型
			慢病毒属	人免疫缺陷病毒 1 型和 2 型
		泡沫逆转录病毒亚科	泡沫病毒属	猴泡沫病毒

注：[a] dsDNA. 双链 DNA；ssDNA. 单链 DNA；dsRNA. 双链 RNA；ssRNA. 单链 RNA；[b] 自 2013 年以来新确定或重命名的分类；[c] 每个乳头瘤病毒属，仅提供一个与人类相关的代表性的种；[d] 包含自 2013 年以来新鉴定的与人类相关或人类致病的种

表 80-4 用于鉴别感染人类的病毒所属科别重要特征的一览表

分类(科)	病毒特性						
	病毒体				基因组		
	包膜	形状	大小(nm)	核衣壳对称性	分子[a]	结构	大小(kb 或 kbp)
腺病毒科	－	轴对称	70～90	二十面体	dsDNA，线性	单分子，反向末端重复序列，5′末端共价结合末端蛋白	26～48
细环病毒科	－	轴对称	30	二十面体	ssDNA，(－)，环状	单分子	2～4
沙粒病毒科	＋	球状	50～300	螺旋对称	ssRNA，(＋/－)环状(非共价闭合)	2 个节段(负链分子或双义分子)	11(总)
星状病毒科	－	轴对称	28～30	二十面体	ssRNA，(＋)，线性	单分子	6～8

（续 表）

分类(科)	病毒特性						
	病毒体				基因组		
	包膜	形状	大小(nm)	核衣壳对称性	分子[a]	结构	大小(kb或kbp)
波纳病毒科	+	球状	90～130	螺旋对称	ssRNA,(－),线性	单分子	9
杯状病毒科	－	轴对称	35～40	二十面体	ssRNA,(+),线性	单分子,5′末端共价结合蛋白(VPg)	7～8
环状病毒科	－	轴对称	15～25	二十面体	ssDNA,环状	单分子	1.7～2.1
冠状病毒科	+	球状,多形	120～160	螺旋对称	ssRNA,(+),线性	单分子	26～32
丁型肝炎病毒属[b]	+	球状	36～43	螺旋对称	ssRNA,(－),环状	单分子,复制时需要乙型肝炎病毒辅助	1.7
丝状病毒科	+	丝状,多形	80×(660～800)	螺旋对称	ssRNA,(－),线性	单分子	19
黄病毒科	+	球状	40～60	二十面体	ssRNA,(+),线性	单分子	9～13
Genomoviridae	－	轴对称	20～22	二十面体	ssDNA,环状	单分子	2.2
汉坦病毒科	+	轴对称,多形	80～120	螺旋对称	ssRNA,(－)环状(非共价封闭)	3 个节段	11～13(总)
嗜肝病毒科	+	球状	42～50	二十面体	dsDNA,环状	单分子,逆转录	3～4
肝炎病毒科	－	轴对称	27～34	二十面体	ssRNA,(+),线性	单分子	7
疱疹病毒科	+	球形	160～300	二十面体	dsDNA,线状	单分子,末端和内部重复序列,多个同质异构形式	125～240
内罗病毒科	+	球形,多形	80～120	螺旋对称	ssRNA,(－)环状(非共价封闭)	3 个节段	19(总)
正黏病毒科	+	多形	80～120	螺旋对称	ssRNA,(－),线性	6～8 个节段,根据属的不同	10～15(总)
乳头瘤病毒科	－	轴对称	55	二十面体	dsDNA,环状	单分子,超螺旋	7～8
副黏病毒科	+	多形	150～300	螺旋对称	ssRNA,(－),线性	单分子	15～20
细小病毒科	－	轴对称	21～26	二十面体	ssDNA,线性	单分子	4～6
周布尼亚病毒科	+	球形,多形	80～120	螺旋对称	ssRNA,(－)环形(非共价封闭)	3 个节段	12～13(总)
白纤病毒科	+	球形,多形	80～120	螺旋对称	ssRNA,(+/－)环形(非共价封闭)	3 个节段(负链分子或双义分子)	11～13(总)
小双 RNA 病毒科	－	轴对称	33～37	二十面体	dsRNA,线性	2 个节段	4.2(总)
小 RNA 病毒科	－	轴对称	30	二十面体	ssRNA,(+),线性	单分子,5′末端共价结合蛋白(VPg)	7～9
肺病毒科	+	多形	150～300	螺旋对称	ssRNA,(－),线性	单分子	13～15.5
多瘤病毒科	－	轴对称	40～45	二十面体	dsDNA,环状	单分子,超螺旋	5
痘病毒科	+	砖形或椭圆形	(140～260)×(220～450)	复杂多样	dsDNA,线性	单分子,反向末端重复序列,双末端共价封闭	130～375
呼肠孤病毒科	－	轴对称	60～85	二十面体	dsRNA,线性	10～12 个节段,根据属的不同	19～32(总)
逆转录病毒科	+	球形	80～100	二十面体	ssRNA,(+),线性	单分子,双倍体,逆转录	7～13
弹状病毒科	+	子弹形	75×180	螺旋对称	ssRNA,(－),线性	单分子	11～15
披膜病毒科	+	球形	60～70	二十面体	ssRNA,(+),线性	单分子	10～12
朊病毒[c]	NA[d]	棒状	PrP^{SC} 蛋白	NA	NA	没有核酸,分子量 33 000～35 000 的可自我复制的感染性朊蛋白	NA

注：[a]dsDNA. 双链 DNA；ssDNA. 单链 DNA；dsRNA. 双链 RNA；ssRNA. 单链 RNA；(+). 正义；(－). 负义；[b]属(未归类到科)；[c]ICTV 尚未分类；[d]NA. 不适用

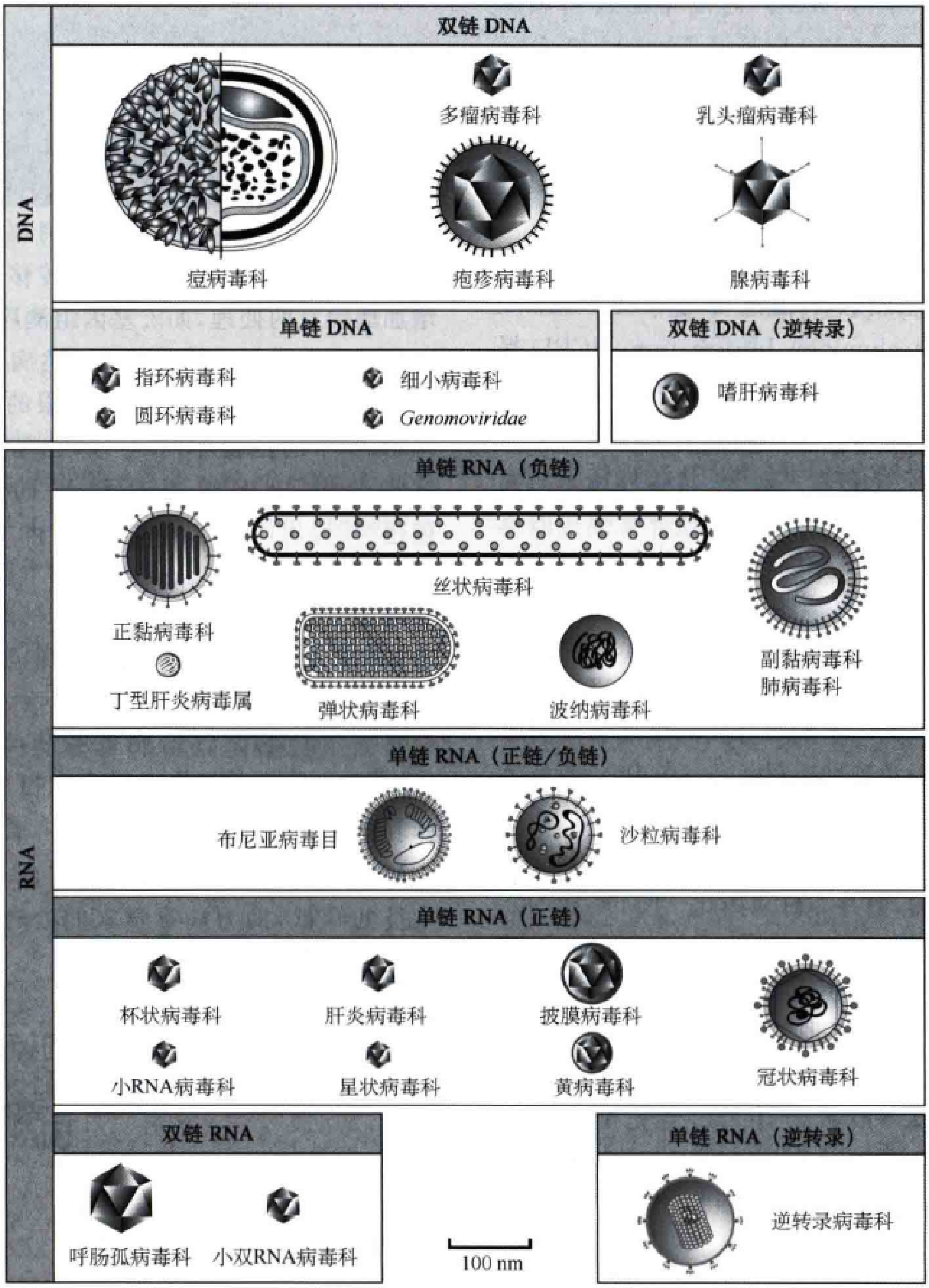


图 80-2 病毒体的形态学。不同科的病毒(包括人类病原体)的形态和大小描述。病毒体是按照比例绘画，但采用了艺术的表现形式来展示病毒体的结构。在描述基因组时，有些展示了衣壳和包膜的横截面结构，对一些小病毒体，仅描述了大小和对称性

五、分类学数据库

(一)ICTV

ICTV 在对病毒进行分类和命名时产生了海量的信息，这些信息被定期发表在 ICTV 的报告中。ICTV 的网站上提供自上次发表以来正式批准的最新分类数据库，以及列出自 ICTV 诞生以来病毒分类变化的历史表格。此外，网站还包括了一个可供搜索的当前分类的分层列表、一个可下载的电子表格——“主物种列表”(the “Master Species List”)，这个表列出了包含所有层次的分层。还可以看到所有提交到 ICTV 执行委员会(ICTV Executive Committee)审批的建议书，以及一个讨论所有与 ICTV 有关的问题的论坛。ICTV 还在杂志 *Archives of Virology* 的“病毒学

新闻"栏目发表关于 ICTV 的工作的新闻和信息[15,37]。此外,经过 ICTV 投票通过的关于分类的任何更新(改变或者添加新的内容),都会有一篇相关的文章发表在 *Archives of Virology*,对所进行的变化和增加的内容进行综述[38-41]。

(二)NCBI

美国国家生物技术信息中心(the National Center for Biotechnology Information, NCBI)提供了丰富的数据库,包含了不同种类的生物信息[42]。其中,GenBank 是包括病毒序列在内的序列数据的最主要储存库[43]。NCBI 还提供了一个从 GenBank 的记录里衍生出来的参考序列的数据库,称为 RefSeq[44],它含有每一个病毒种(species)的一个代表性的基因组序列。有关病毒的 RefSeq 的记录被 NCBI 的管理人进行了全面注释,很多条例请了相关的病毒种有专门研究的专家进行了审阅。每一个病毒分类等级的每个类群都分配有一个分类识别码(taxonomy ID),通过这个 ID,每一个病毒的序列都可以链接到 NCBI 的数据库。虽然 ICTV 和 NCBI 这 2 个分类系统应该是完全符合的,但并非总是如此。ICTV 和 NCBI 一直在做工作,更新 NCBI 的病毒分类,以使 NCBI 能够及时反映出官方 ICTV 的分类内容。遗憾的是,当 ICTV 新批准了病毒的分类时,NCBI 的分类数据库不能自动更新。ICTV 正式新批准的病毒分类,一般数个月之后会完全呈现在 NCBI 分类数据库并关联到 NCBI 链接的 GenBank 和 RefSeq 的序列记录中。

六、未来的挑战

当前和未来有很多挑战会影响到病毒的分类工作。这些挑战包括:①新的未知病毒的发现[45-47];②病毒进化的遗传机制和结构的全面考虑(包括基因重组和基因水平转移)[48-51];③巨量增加的信息的处理,如宏基因组测序(metagenomic sequencing)数据[52-55];④描述病毒的新数据特征(characters)的确定;⑤仅有限的分类特征的获得(如单个的基因序列)[56-58];⑥基于人们增加的病毒进化知识的更高级别的分类层次的创建[28-29]。

2016 年,一个研讨会讨论了宏基因组测序及其对病毒分类的影响[59]。会议参与者发表了一份共识声明[60]赞同单独根据有效的宏基因组数据对病毒进行分类,并拟定了一套基于宏基因组数据建立新病毒分类的指南。ICTV 执行委员会赞同这些提议。研讨会计划围绕上述其他困难和挑战展开讨论。幸运的是,新的分析方法、新的分类途径,还有世界各地的研究人员的奉献,助力病毒学家们处理这些挑战,也能应对未来的挑战。

参考文献请扫二维码查阅

第81章 标本采集、转运和处理：病毒学

JAMES J. DUNN，BENJAMIN A. PINSKY

（喻华 译；王大燕、曹彬 审校）

实验室的检验报告在临床诊断中具有十分重要的作用，为确保检验结果的准确性，发现和纠正潜在的误差，保证检验全过程系统的可追溯性（分析前、分析中和分析后）非常关键。而分析前阶段常常是整个检测过程中最薄弱的环节，分析前错误占实验室诊断错误的大多数[1]。本章就病毒诊断的分析前阶段进行了阐述，包括标本选择、采集、运送和处理，并详述了一些特殊类型标本的采集。然而，这些建议仅仅是常规操作的一般准则，实验室必须参照所用商品化试剂盒和试剂的厂家说明书进行样本检测。

应该对分析前阶段的可变因素进行控制，以确保标本的质量。因此，实验室须针对机构内所有临床标本采集区域或其他提交标本的地点制定完善的标本采集操作规程，内容包括：检验种类、适应证及标本采集方法。该操作规程需要详细说明：①不同临床综合征的标本类型（表81-1）；②标本采集所需要的装置/容器和运输培养基；③采集方法和技术；④需采集标本的体积；⑤标本的标识方法；⑥运送时间及贮存条件；⑦尽可能获得临床资料[2]。

表81-1　病毒检测的标本类型和方法

来源和疾病	病毒[a]	标本类型[b]	检测方法[c]
心血管系统			
心肌炎/心包炎	腺病毒	血液、呼吸道、组织	培养、组织学、IA、NAAT
	CMV	血液、组织、尿	培养、组织学、NAAT
	肠道病毒	血液、呼吸道、粪便、组织	培养、NAAT
	流感病毒	呼吸道、组织	培养、IA、NAAT、血清学
皮肤			
皮疹	腺病毒	血液、呼吸道	培养、IA、NAAT
	基孔肯尼雅病毒	血液、尿	NAAT、血清学
	登革热病毒	血液、尿	IA、NAAT、血清学
	EBV	血液	NAAT、血清学
	肠道病毒	血液、呼吸道、粪便	培养、NAAT
	HHV-6	血液	NAAT、血清学
	麻疹病毒	血液、呼吸道、尿	培养、NAAT、血清学
	细小病毒B19	血液	NAAT、血清学
	风疹病毒	血液、呼吸道、尿	培养、血清学
	寨卡病毒	血液、尿	NAAT、血清学
乳头状瘤/丘疹	传染性软疣病毒	组织	细胞学、组织学
	人乳头状瘤病毒	组织/细胞	细胞学、组织学、NAAT
疱疹	肠道病毒	血液、呼吸道、粪便、水疱	培养、NAAT

（续 表）

来源和疾病	病毒[a]	标本类型[b]	检测方法[c]
	HSV	伤口	培养、IA、NAAT
	痘病毒[d]	血液、呼吸道、组织、水疱	培养、EM、组织学、NAAT
	VZV	呼吸道、水疱	培养、IA、NAAT
消化系统			
腹泻	腺病毒40和41型（ADV40&41）	粪便	IA、NAAT
	星状病毒	粪便	NAAT
	杆状病毒	粪便	NAAT
腹泻	CMV	血液、粪便、组织	培养、组织学、NAAT
	人博卡病毒	粪便	NAAT
	副肠孤病毒	粪便	培养、NAAT
	轮状病毒	粪便	IA、NAAT
肝炎	腺病毒	血液、组织	培养、组织学、IA、NAAT
	CMV	血液、组织	培养、组织学、NAAT
	EBV	血液	NAAT、血清学
	HAV	血液	血清学
	HBV	血液	IA、NAAT、血清学
	HCV	血液	NAAT、血清学
	HDV	血液	IA、血清学
	HEV	血液	NAAT、血清学
	HSV	血液、组织	培养、组织学、IA、NAAT
造血系统			
骨髓抑制	CMV	血液、骨髓	培养、IA、NAAT
	登革热病毒	血液、骨髓	NAAT、血清学
	EBV	血液、骨髓	组织学、NAAT
	HAV	血液	NAAT、血清学
	HBV	血液	NAAT、血清学
	HCV	血液	NAAT、血清学
	HHV-6	血液、骨髓	NAAT
	HHV-8	血液、骨髓	组织学、NAAT
	HIV-1	血液	NAAT、血清学
	细小病毒B19	血液、骨髓	NAAT、血清学
溶血性贫血	CMV	血液、骨髓	培养、IA、NAAT
	EBV	血液、骨髓	组织学、NAAT
	HBV	血液	NAAT、血清学
	HCV	血液	NAAT、血清学
淋巴系统（B细胞和T细胞）紊乱	EBV	血液、骨髓	组织学、NAAT
	CMV	血液、骨髓	培养、IA、NAAT
	HIV-1	血液	NAAT、血清学
	HHV-8	血液、骨髓	IA、NAAT
	HTLV-1	血液、骨髓	NAAT、血清学
新生儿/胎儿	CMV	羊水、血液、唾液、尿	培养、NAAT
	肠道病毒	血液、脑脊液、尿	培养、NAAT
	HBV	血液	血清学
	HIV	血液	NAAT、血清学

（续　表）

来源和疾病	病毒[a]	标本类型[b]	检测方法[c]
	HSV	血液、脑脊液、水疱	培养、IA、NAAT
	副肠孤病毒	血液、脑脊液、呼吸道、尿	培养、NAAT
新生儿/胎儿	细小病毒 B19	血液、羊水	NAAT、血清学
	风疹病毒	血液、尿	培养、NAAT
	VZV	羊水、血液、脑脊液、水疱	培养、IA、NAAT、血清学
神经系统			
急性弛缓性脊髓炎	虫媒病毒	血液、脑脊液	NAAT、血清学
	肠道病毒	血液、脑脊液、粪便、呼吸道	培养、NAAT
脑炎	虫媒病毒	血液、脑脊液	NAAT、血清学
	BK 病毒	脑脊液、组织	NAAT
	CMV	脑脊液	NAAT
	EBV	脑脊液	NAAT
	肠道病毒	脑脊液	培养、NAAT
	HHV-6	脑脊液	NAAT
	HSV	脑脊液	NAAT
	HIV	脑脊液	NAAT
	麻疹病毒	血液、脑脊液、尿	培养、NAAT、血清学
	腮腺炎病毒	血液、脑脊液、唾液、尿	培养、NAAT、血清学
	副肠孤病毒	脑脊液	培养、NAAT
	狂犬病病毒	血液、脑脊液、唾液、组织（项颈部）	IA、NAAT、血清学
	VZV	脑脊液	NAAT
脑膜炎	虫媒病毒	血液、脑脊液	NAAT、血清学
	肠道病毒	脑脊液	培养、NAAT
	HSV	脑脊液	NAAT
	淋巴细胞脉络丛脑膜炎病毒（LCMV）	血液、脑脊液	血清学
	腮腺炎病毒	血液、脑脊液、尿	培养、NAAT、血清学
	副肠孤病毒	脑脊液	培养、NAAT
	VZV	脑脊液	NAAT
PML[e]	JC 病毒	脑脊液，组织	组织学、NAAT
眼部			
结膜炎	腺病毒	眼、呼吸道	培养、IA、NAAT
	肠道病毒	眼、呼吸道	培养、NAAT
	HSV	眼	培养、IA、NAAT
角膜炎	腺病毒	眼、呼吸道	培养、IA、NAAT
	肠道病毒	眼、呼吸道	培养、NAAT
	HSV	眼	培养、IA、NAAT
	VZV	眼	培养、IA、NAAT
葡萄膜炎/视网膜炎	CMV	眼	NAAT
	HSV	眼	NAAT
	VZV	眼	NAAT
呼吸系统			
细支气管炎	腺病毒	呼吸道	培养、IA、NAAT
	肠道病毒	呼吸道	培养、NAAT

(续 表)

来源和疾病	病毒[a]	标本类型[b]	检测方法[c]
	人博卡病毒	呼吸道	NAAT
	人冠状病毒	血液、呼吸道	EM、NAAT、血清学
	人偏肺病毒	呼吸道	IA、NAAT
	流感病毒	呼吸道	培养、IA、NAAT
	副流感病毒	呼吸道	培养、IA、NAAT
	RSV	呼吸道	培养、IA、NAAT
	鼻病毒	呼吸道	培养、NAAT
喉炎	人博卡病毒	呼吸道	NAAT
	人冠状病毒	血液、呼吸道	EM、NAAT、血清学
	人偏肺病毒	呼吸道	IA、NAAT
	流感病毒	呼吸道	培养、IA、NAAT
	副流感病毒	呼吸道	培养、IA、NAAT
	鼻病毒	呼吸道	培养、NAAT
	RSV	呼吸道	培养、IA、NAAT
腮腺炎	腺病毒	呼吸道	培养、IA、NAAT
	CMV	血液、呼吸道	培养、NAAT
	EBV	血液	NAAT、血清学
	肠道病毒	血液、呼吸道、粪便	培养、NAAT
	HIV-1	血液	血清学
	腮腺炎病毒	血液、呼吸道、尿	培养、NAAT、血清学
咽炎/上呼吸道感染	腺病毒	呼吸道	培养、IA、NAAT
	EBV	血液	血清学
	肠道病毒	呼吸道	培养、NAAT
	HSV	呼吸道	培养、NAAT
	人冠状病毒	呼吸道	NAAT
	人偏肺病毒	呼吸道	IA、NAAT
	流感病毒	呼吸道	培养、IA、NAAT
	副流感病毒	呼吸道	培养、IA、NAAT
	鼻病毒	呼吸道	培养、NAAT
	RSV	呼吸道	培养、IA、NAAT
胸膜痛	肠道病毒	呼吸道	培养、NAAT
肺炎	腺病毒	呼吸道	培养、IA、NAAT
	CMV	血液、呼吸道、组织	培养、组织学、IA、NAAT
	汉坦病毒	血液、组织	NAAT、血清学
	HSV	呼吸道、组织	培养、组织学、NAAT
	人冠状病毒	血液、呼吸道	NAAT、血清学
	人偏肺病毒	呼吸道	NAAT
	流感病毒	呼吸道	培养、IA、NAAT
肺炎	麻疹病毒	血液、呼吸道、尿	培养、NAAT、血清学
	副流感病毒	呼吸道	培养、IA、NAAT
	鼻病毒	呼吸道	培养、NAAT
	RSV	呼吸道	培养、IA、NAAT
	VZV	呼吸道、组织	培养、组织学、NAAT
鼻炎	腺病毒	呼吸道	培养、IA、NAAT
	肠道病毒	呼吸道	培养、NAAT

（续　表）

来源和疾病	病毒[a]	标本类型[b]	检测方法[c]
	人冠状病毒	呼吸道	NAAT
	人偏肺病毒	呼吸道	NAAT
	流感病毒	呼吸道	培养、IA、NAAT
	副流感病毒	呼吸道	培养、IA、NAAT
	鼻病毒	呼吸道	培养、NAAT
	RSV	呼吸道	培养、IA、NAAT
泌尿生殖系统			
宫颈炎、尿道炎	腺病毒	生殖道	培养
	CMV	生殖道、组织	培养、组织、NAAT
	HSV	生殖道	培养、NAAT
生殖器疣、肿瘤	HPV	生殖道、组织	组织学、NAAT
出血性膀胱炎	腺病毒	尿	培养、NAAT
	BK 病毒	尿	NAAT
	CMV	尿	培养、NAAT
生殖器疱疹	HSV	破损部位	培养、IA、NAAT
	VZV	破损部位	培养、IA、NAAT
睾丸炎、附睾炎	腮腺炎病毒	血液	血清学
丘疹	传染性软疣病毒	组织	组织学
直肠炎	HSV	直肠	培养、NAAT

注：[a]针对各病毒的内容参见特定章节；仅列出常见病毒性病原体。HHV-6. 人类疱疹病毒6型；HAV. 甲型肝炎病毒；HTLV-1. 1型人T细胞白血病病毒；LCMV. 淋巴细胞脉络丛脑膜炎病毒。[b]常见病毒诊断标本类型；针对各病毒的标本类型参见特定章节。“呼吸道”标本主要包括咽喉部和鼻部拭子、鼻洗液、鼻咽吸取物、气管和支气管肺泡灌洗液（BAL）标本。“眼”部标本包括结膜、角膜、房水和玻璃体液。[c]主要是常见的检测方法，EM. 电子显微镜方法；IA. 免疫分析（包括免疫荧光抗体、ELISA或免疫层析试验）；NAAT. 核酸扩增试验。[d]天花病毒和出血热病毒（如埃博拉病毒和马尔堡病毒）需要在BSL4的实验室中进行处理。[e]PML. 进行性多灶性白质脑病

一、标本选择

病毒感染人类可引起多种疾病。在病毒检测时，标本采集的种类主要受感染导致的体征和症状的影响。此外，还需考虑诸如流行病学因素（如旅行地区、暴露情况及季节性因素等）和患者机体免疫状态等因素。重要的是，需要认识到不同病毒在致病机制、从原发感染部位的扩散能力及感染的器官等方面是不同的。一般而言，如何选择标本，通常由最能够进行特定临床诊断的试验所决定（第83章）。某些疾病的诊断需要对病毒的致病机制、累及脏器和病毒流行病学有了基本了解后，针对性地选择合适的标本类型和检测方法进行检验分析。很多类似的临床症状可由不同病毒所引起，因此，无法根据患者临床症状推测其感染的是某一种或是多种类型的病毒，从而使得标本选择更为复杂（表81-1）。所以，如果只针对某一特定病毒的检测来进行标本采集，可能会忽略很多其他病因学因素。

根据标本采集时的解剖部位和采集手段，采集到的标本分为非无菌[如细菌和（或）真菌污染]和无菌标本。因为细菌和真菌在营养丰富的细胞培养基中可以快速生长，所以非无菌和无菌的标本类型决定了病毒培养前标本的前处理程度。如果是基于非培养的检测方法，则受上述因素的干扰较小。无菌标本采自无菌部位（如血液、脑脊液和组织），所以在标本采集过程中要注意避免与有菌部位的接触。非无菌标本采自含有正常生物群的部位（如上呼吸系统、皮肤、下生殖道和粪便），或是采自无菌部位，但在标本采集过程中不可避免的会与有菌部位接触（如痰和尿）。

二、标本采集

在临床工作中，由于没有任何一种单一的诊

断方法可以作为检测病毒的最适方法，所以，非常有必要采集多种不同类型的标本和(或)连续多个时间点采集不同时间点的标本(纵向采集标本)以满足多种检测方法联合检验，获得最有用的医学诊疗信息[2]。在通过宏基因组鉴定病原体的时代，这些都是非常重要的考量，因为测序方法还没有达到靶向检测所具备的敏感性[3-4]。为了优化病毒的诊断，患者出现症状后，要尽早采集标本。许多健康和免疫功能正常的人群感染病毒后，阳性检出率最高的时机是在疾病发生后的前 3 天，并且随着病程的进展，检出率快速下降[5]。但在播散性疾病或免疫功能低下的患者中，在较长的时间内都可能检测到病毒[6]。一般而言，病毒的排毒量和排毒时间取决于病毒种类、累及的器官或系统，以及患者年龄和免疫功能状态等宿主因素[7-9]。若标本中含有高浓度的病毒颗粒、病毒抗原(antigen，Ag)或病毒核酸(nucleic acid，NA)将提高临床实验室的诊断正确率。标本采集技术可极大地影响标本质量及最终的检测结果。应采集足够量的样本，特别是液体标本(如脑脊液、血液和尿)，并严格按照标准采集流程，以减少变异因素。但是，拭子标本的采集极易受变异因素的影响，会影响拭子上活病毒、病毒核酸或抗原的量。

在进行病毒的血清学诊断时，要根据不同病毒选择不同的血清采集时间和检测抗体类型。对于急性感染期的患者，应在发病早期采集血清，以检测病毒特异的 IgM 抗体。恢复期的患者，应在疾病急性发作后的 2～4 周采集血清，以检测 IgG 抗体。此外，还需同时检测急性期和恢复期的血清样本，比较两者抗体浓度是否有显著变化。然而，由于恢复期标本采集的延迟，所以检测结果通常不会影响患者的治疗。对于一些病毒(如 SARS-CoV)，恢复期的标本采集可能需要延迟到发病后 4 周以上，才能排除感染[10]。另外，潜伏或持续病毒造成感染的再活化，可能检测不到患者体内 IgM 和(或)IgG 水平的升高。一般情况下，与 IgG 相比，反复冻融对 IgM 效价的影响更大，应避免对样品的反复冻融。

在进行患者标本采集时，医护人员应注意穿戴个人防护装备，以防止采集过程中通过接触、空气或液滴等造成医护人员感染[11-12]。应事先通知实验室须警惕对实验室工作人员有风险的可疑罕见病原(如出血热病毒或新型流感病毒等)。如果标本中疑似有这类病毒，标本处理应该在相应级别的生物安全实验室进行。通常大多数病毒可在生物安全 2 级实验室进行处理(BSL-2)，而某些特定病毒(如 SARS 冠状病毒)则需在生物安全 3 级实验室进行处理(BSL-3)。同时，对于怀疑携带非 BSL2 病原体(BSL-3 或 BSL-4 病原体)的样本，实验室应提供标本采集和运送的操作指南。这些高致病病毒一般不在常规临床实验室中进行培养，而是在疾病控制中心(CDC，美国佐乔治亚州亚特兰大。译者注：在其他国家应送至具备相应生物安全条件的实验室)进行处理。操作处理上述高致病性病毒标本或组织，包括恢复期患者的血清样本，可能造成严重的生物危害，在非 BSL 4 实验室操作时应将生物危害的影响最小化。使用注射器和针头采血时，需要将血注入到试管中，就必须将注射器和针头拆分，所以使用真空采集装置更为安全，尽量避免采集过程中产生气溶胶。在生物安全柜(biosafety cabinet，BSC)进行核酸提取可以在分析前灭活病毒[13]。当处理怀疑含有高风险病原体的标本时，应咨询和参照 CDC 指南中的具体信息。

三、运输培养基

根据标本来源和检测方法的要求，病毒标本在运送过程中需要保存在适当的病毒运输培养基(viral transport medium，VTM)中。液体标本，如羊水、血液、脑脊液、尿和支气管肺泡灌洗液一般不需要使用 VTM 进行运送[14]。易干燥的病毒标本(如拭子和组织样本)必须采用 VTM 或其他相应的缓冲液保持样本湿润，以维持培养用感染性病毒颗粒的效价及保持直接抗原检测或核酸扩增试验(nucleic acid amplification tests，NAATs)的病毒抗原和核酸的稳定。但是分子诊断试验可以除外，因为已发现某些核酸标本在干燥状态下非常稳定。干燥的病毒标本在 NAAT 检测时具有以下优点：①室温条件下可保存相对较长时间；②无标本溢洒风险和低感染性，从而降低了对实验室人员的生物安全风险；③运送简单、便宜，无需冷链运送。不过，液体标本检测用途广，具有诸多优势(如样本可分装及检测手段多样化等)。当标本需要进行多种微生物检测时，如病毒、细菌、

分枝杆菌和真菌，采集的标本中不应加入 VTM，因为该培养基同时含有抗细菌和抗真菌成分。需要分别采样或将标本分装至合适的运输培养基中。

最佳的病毒转运体系是运送后的标本可同时供多种检测手段进行病毒检测，包括细胞培养、抗原检测和 NAAT 等。虽然一些常见病毒在合适的运送液中，可以在室温条件下保存较长时间，但是一般来说，病毒活力会随着保存时间的延长而逐渐降低，尤其是在较高的温度下，会加速病毒活力的下降。为了保持病毒的活力和效价，检测前通常将病毒样本置于冰上。最佳的运输培养基应能够保持病毒活力稳定和最大限度延缓效价下降，而且需要含有抗微生物污染的成分，同时还需具有较长的保质期和合理的价格[14-15]。一般而言，VTM 的配方常含有缓冲盐溶液，如在 Hank 缓冲液中加入 HEPES 以保持缓冲液 pH 为中性，加入牛血清白蛋白（bovine serum albumin，BSA）或明胶等蛋白稳定剂，以及抑制细菌和（或）真菌过度生长的抗菌药物。有实验室报道表明，一些细菌标本运输培养基也可以用于病毒标本的采集和转运。在实验研究测试条件下，用于细菌检测的拭子运送体系在 4℃ 或室温条件下贮存 5 天，仍可用于 A 型流感病毒、ECHO 病毒 30 型（echovirus30）、2 型单纯疱疹病毒和腺病毒的核酸检测，尽管与贮存在 VTM 的拭子相比，敏感性有所降低[16]。

VTM 可以由实验室自行配制或购买商品化的产品（表 81-2）。商品化运输培养基的优点是质量控制由生产厂商承担[17]。一些运输培养基也适用于衣原体、支原体和脲原体等，尽管针对这些病原体的培养和诊断并没有常规进行。如需长时间低温（≤－70℃或更低）冻存病毒标本，在 VTM 中加入蔗糖等冷冻保护剂有利于保持病毒的完整性。由于不同检测手段对样本要求不同，临床实验人员应正确评估所选择的 VTM 是否适合后续的病毒检测[17-18]。

表 81-2　病毒诊断用运输培养基的商品化试剂盒

缓冲液品牌	组成成分	体积(ml)	储藏温度(℃)
BD UniversalVTM[a] (BD Diagnostics)	基础成分[b]、明胶、L-半胱氨酸、蔗糖、多黏菌素、万古霉素	1 或 3	2～25
Copan Universal Transport Medium[a] (Copan Diagnostics)	基础成分、明胶、L-半胱氨酸、蔗糖、多黏菌素、万古霉素	1、3、10	2～25
CVM Transport Medium[a] (Hardy Diagnostics)	基础成分、明胶、蔗糖、多黏菌素、万古霉素	2	2～8
TransPRO CVM transport (Hardy Diagnostics)	基础成分、明胶、L-半胱氨酸、蔗糖、多黏菌素、万古霉素	3	2～25
FlexTrans Viral Transport Medium (Trinity Biotech)	基础成分、蔗糖、庆大霉素、链霉素	2	2～8
Meridian Viral Transport[a] (Meridian Bioscience)	胰蛋白酶胨磷酸盐肉汤、明胶、庆大霉素	1.5	5～25
MicroTest M4[a] (Remel)	基础成分、明胶、蔗糖、多黏菌素、万古霉素	3	2～8
MicroTest M4RT[a] (Remel)	基础成分、明胶、蔗糖、庆大霉素	3	2～30
MicroTest M5[a] (Remel)	基础成分、蛋白质稳定剂、蔗糖、多黏菌素、万古霉素	3	2～8
MicroTest M6[a] (Remel)	基础成分、明胶、蔗糖、多黏菌素、万古霉素	1.5	2～30
Multitrans Medium[a] (Starplex Scientific)	基础成分、明胶、蔗糖、碳酸氢钠、多黏菌素、万古霉素	3	2～25
Puritan UniTranz-RT[a] (Puritan Medical)	基础成分、明胶、蔗糖、多黏菌素、万古霉素	1 或 3	2～25
Sigma VCM medium[a] (Medical Wire & Equipment)	平衡盐缓冲液、HEPES、磷酸氢二钠、蔗糖、乳清蛋白水解物、多黏菌素、万古霉素、两性霉素 B	1、1.5、3	5～25
Sigma Virocult medium[a] (Medical Wire & Equipment)	平衡盐缓冲液、磷酸氢二钠、乳清蛋白水解物、氯霉素、两性霉素 B	1 或 2	5～25
ViraTrans Medium (Trinity Biotech)	基础成分、庆大霉素、青霉素、链霉素	2	2～8

注：[a] 产品为拭子和转运管组合包装；[b] 基础成分：Hank 平衡盐溶液、牛血清白蛋白、L-谷氨酸、HEPES 缓冲液（pH7.3）、酚红和两性霉素 B

通常，如果采用商品化试剂盒进行 NAAT 或 Ag 检测，生产厂商会提供标本运输培养基或对相应运送体系进行说明。同时，商品说明书也应该推荐适当的采集和转运体系。绝大多数 VTM 产品都能兼容后续病毒 NA 和 Ag 检测[14,19]，但需要注意，非 FDA 体外诊断制造商推荐的运送培养基需要通过实验室内部验证。

四、运送条件

标本采集后应尽快送至实验室，因病毒活力会随着时间延长而降低（如一些临床上重要的病毒比其他病毒更不稳定）。临床标本的运送、处理和贮存（见下文）应坚持选择最佳时间和温度，以得到准确并有意义的结果。通常情况下，拟进行病毒培养的标本最好采集后 2～4 h 内尽快送至实验室，尽快对标本进行病毒培养可提高总诊断率。病毒培养首选的运送温度应在 2～8℃。标本中能够灭活病毒或者降解蛋白和核酸的酶类，在冷藏温度时活性较低。若标本运送或提交至参考实验室的时间较长，标本应在更低的温度下储存和转运，以保持样本的完整性。比如，采集血清或血浆样本进行 NA 检测时，需要冰冻标本。病毒活性对 Ag 检测或核酸检测来说不是必备条件，所以转运时间就相对宽松，除非需要考虑完整细胞、病毒蛋白或病毒核酸的降解。不过，为了及时检测，应尽量避免标本运送至实验室的时间延迟。

五、标本储存和处理

经认可的实验室应针对标本采集、运送或储存条件不规范的标本，制定相应的拒收标准。常见标本拒收情况主要有：①未标记或标记不准确；②容器使用不当或容器泄漏；③不适于特定检测；④运送条件不合适；⑤运送时间超过时间限制。盛放标本的容器至少需标注患者全名、住院号或其他唯一标识、采样日期时间、标本来源及采集者名字等。此外，每个送检标本都应带有检测申请单（纸质版或电子版），含有与标本容器上一样的信息，还应写有患者位置、申请检测项目、标本来源、送检医生联系信息、初步临床诊断等[20]。对于再次采集较困难（如外科手术中采集的组织样本）的标本，即使送检标本不符合送检要求，实验室也可根据此类标本的接收流程，进行标本接收和后续病毒检测。

用于病毒分离的样本，在病毒接种细胞培养前，可在冷藏条件（2～8℃）下保存 2 天。许多病毒在室温甚至冷藏条件下会丧失感染能力。如呼吸道合胞病毒（RSV）在 4℃保存 4 天或 37℃保存 24 h 后，其感染力下降 90%[21]。通常需要进行病毒分离的标本，不推荐低温冷冻（≤－70℃或更低）保存，除非该标本在 2 天内无法进行操作。标准冰箱（－20℃）的温度不够低，不能保持病毒的感染力。反复冻融也会降低某些病毒的感染力，如具有包膜的病毒。有关病毒培养的操作指南已在相关文献和著作中进行了详细的阐述[22-23]。标本的处理需严格按照所有适用的生物安全指南进行[24]，在处理含有疑似经空气传播病毒的标本时，必须在生物安全柜中进行。

分子生物学检测法尤其易受到不当的分析前环境条件的影响。对于 RNA 病毒来说，如 HIV 或 HCV，进行分子生物学检测时，CLSI 推荐采用 EDTA 抗凝的静脉全血标本，在 4h 内完成离心并将血浆转移至另一支试管内，但实际的操作时间，需按照厂商试剂盒说明要求进行[25]。不过，也有研究表明在 HIV-1 病毒载量测定中，EDTA 抗凝全血和无细胞 EDTA 血浆可在室温条件下稳定保存达 30 h，4℃稳定保存达 14 天，－70℃可长期保存，病毒载量不会显著下降[26-27]，HCV 的 RNA 在 EDTA 抗凝全血中可在室温保存至少 24 h[28]。在枸橼酸盐葡萄糖（acid citrate dextrose，ACD）或 EDTA 抗凝全血中的 HIV 前病毒 DNA 在室温或 4℃保存 10 天后，仍可进行检测[29]。部分美国 FDA 批准/核准的 NAAT 所需的分析前步骤见表 81-3。

采用 RNAlater（Qiagen）RNA 稳定缓冲液，可以使血浆中 HIV 和 HCV 的病毒载量在 37℃条件下稳定保存 28 天，冻存或者在 RNAlater 中室温存放，HCV 病毒载量可以 5 天基本不变[30]。在实验室研究测试条件下，无包膜和有包膜病毒（包括 HIV-1）室温下在 RNAlater 缓冲液中可至少稳定保存 72 h[31]。AVL 缓冲液（Qiagen）是一种含有异硫氰酸胍和核糖核酸内切酶（RNase）抑制剂的裂解液，用于核酸纯化，将含有病毒的标本冷藏（4℃）或冷冻（－20℃）于AVL缓冲液中，虫

表 81-3　部分 FDA 批准的核酸检测方法所需的血液标本处理和储存条件

检测法(生产商)	标本类型	分离条件	血浆/血清短期保存	最大冻融次数
Aptima HCV RNA Qualitative (Hologic)	EDTA、ACD、枸橼酸盐、肝素、PPT 或血清	≤24h,15～30℃	≤48h,2～8℃,或≤－20℃	3
Aptima HCV Quant Dx(Hologic)	EDTA、ACD、PPT 或血清	≤6h,2～30℃	≤24h,2～25℃,或≤5 天,2～8℃	3
Aptima HIV-1 RNA Qualitative (Hologic)	EDTA、ACD、枸橼酸盐、PPT 或血清	≤3 天,≤25℃	≤5 天,2～8℃,或≤－20℃	3
Aptima HIV-1 Quant(Hologic)	EDTA、ACD 或 PPT	≤24h,2～30℃	≤5 天,2～8℃,或≤90 天,－20～－70℃	3
COBAS Amplicor HCV Monitor (Roche)	EDTA、ACD 或血清	≤6h,2～25℃	≤3 天,2～8℃或－70℃	2
COBAS Amplicor HIV-1 Monitor (Roche)	EDTA 或 ACD	≤6h,2～25℃	≤5 天,2～8℃,或－70℃	3
COBAS AmpliPrep/COBAS TaqMan CMV(Roche)	EDTA	≤24h,≤25℃	≤7 天,2～8℃,或≤6 周,≤－20℃	3
COBAS AmpliPrep/COBAS TaqMan HBV(Roche)	EDTA 或血清	≤24h,2～25℃	≤3 天,15～30℃;≤7 天,2～8℃,或≤6 周,－20～－80℃	5
COBAS AmpliPrep/COBAS TaqMan HCV(Roche)	EDTA 或血清	≤24h,2～25℃	≤3 天,4℃,或≤6 周,－20～－70℃	5
COBAS AmpliPep/COBAS TaqMan HIV-1(Roche)	EDTA	≤24h,2～25℃	≤24h,15～30℃;≤6 天,2～8℃,或≤6 周－20～－80℃	5
Qiagen artus CMV RGO MDx	EDTA	≤24h,20～25℃	≤24h,20～25℃或≤8 周,－15～－30℃	2
RealTime HBV(Abbott)	EDTA 或血清	≤6h,2～30℃	≤24h,15～30℃;≤3 天,2～8℃,或≤－70℃	1[a]
RealTime HCV(Abbott)	EDTA 或血清	≤6h,2～30℃	≤24h,15～30℃;≤3 天,2～8℃,或≤60 天,≤－70℃	1[a]
RealTime HIV-1(Abbott)	EDTA 或 ACD	≤6h,15～30℃或≤24h,2～8℃	≤24h,15～30℃;≤5 天,2～8℃或≤60 天,≤－20℃	3[a]
RealTime CMV(Abbott)	EDTA	≤24h,3～30℃	≤24h,15～30℃;≤5 天,2～8℃,或≤－70℃	3[a]

注:[a] 解冻标本于 15～30℃,或 2～8℃,一旦解冻,标本储存于 2～8℃的时间不应超过 6 h

媒病毒 RNA 可稳定保存至少 35 天[32]。但 AVL 缓冲液成分会灭活病毒,导致该缓冲液处理后的病毒标本丧失其感染力。肠道病毒 RNA 在脑脊液标本中可在 4℃和－80℃条件下稳定保存 2 周,但在室温条件下保存时,病毒活性半衰期为 9 天。鼻咽洗液标本中,A 型流感病毒在室温、4℃或－80℃条件下保存 2 周,其浓度会下降 60%[33]。由于 RNase 在－20℃条件下,仍能造成标本中 RNA 的降解,所以对于未加入特异 RNase 抑制剂的标本如需长期保存,则应储存于－70℃或以下温度,以抑制 RNase 的活性[34]。

对于 DNA 病毒如巨细胞病毒(cytomegalovirus,CMV)来说,储存后 DNA 的定量数据尚不一致,有些研究表明 CMV 的 DNA 水平在保存 24 h[35]、72 h[36]和 2 周后[37]基本无下降,而也有研究表明全血样本在血浆分离前储存于室温或 4℃下,CMV 水平发生了上升[38]。因为在 CMV 潜伏感染的患者中,采集超过 2h 后分离的血浆标本,其中的淋巴细胞已经发生裂解,释放出 CMV,就会造成 CMV 的 DNA 水平升高,出现假阳性结果。另一项研究表明,在 EDTA 抗凝全血中,CMV DNA 在室温、4℃和－80℃下可稳定保存长

达2周，但在血清中，CMV的DNA半衰期在室温、4℃和−80℃下分别为少于1天、2天和3天[33]。在5℃和25℃条件下保存28天，血浆中的乙型肝炎病毒(HBV)浓度均无显著下降[27]。对于单纯疱疹病毒(HSV)而言，来源于口腔和生殖道的标本置于VTM中，于−20℃保存16个月后，超过90%的标本中病毒浓度在原始浓度的1个对数值以内[39]。−70～23℃下保存长达30天后，仍可通过PCR方法检测到CSF标本HSV的DNA[40]。对于人乳头瘤病毒(HPV)，在2～8℃条件下，2种商品化液体细胞基质可稳定保存其DNA超过2年。但是，由于核酸提取和检测方法的不同，保存后的样本，其结果重复性会受到影响[41]。一般来说，组织中的DNA可在4℃稳定保存24 h，−20℃至少稳定保存2周，−70℃或以下温度至少稳定保存2年[25]。

轮状病毒RNA可以在室温条件下稳定保存2.5个月，但还没有深入的研究来评估核酸在粪便标本中的稳定性[42]。有研究表明，在−20～37℃下保存4个月，仍可检测到使用SDS-EDTA预处理的层析试验条采集的新鲜大便标本中的腺病毒DNA[43]，并且在实验条件下，含有不同浓度诸如病毒的试验条在−80～37℃下保存达2个月，仍可稳定用于逆转录PCR的检测[44]。

六、标本采集方法和标本处理

对于FDA核准/批准的商品化试剂盒，实验室必须严格按照厂商说明书进行标本的采集和操作处理。如要对厂商说明书中要求的分析前处理步骤作出任何改动，实验室必须先进行性能验证[51-52]。对于实验室自行设计的检测方法(laboratory-developed tests，LDTs)，实验室可以基于自己的研究数据或是已发表的参考文献，对每个实验点都必须建立并验证适合的操作流程和贮存条件。同样，如果使用者改变了任何FDA所批准的采集和处理条件，实验室必须进行相应的验证实验，并作为LDT。

(一)羊水

虽然在怀孕期间发生病毒感染的机会较少，但一旦发生可能对胎儿或新生儿造成危害。对孕妇羊水标本进行病毒检测，一般是基于孕产史或超声下指征。羊水标本通过羊膜腔穿刺术进行采集，抽取2～5 ml孕妇羊水至无菌容器中。NA检测是最普遍使用的检测方法。羊水中病毒核酸应尽早提取，若48 h内无法进行检测，可在2～8℃条件下储存不超过48 h或转移至−70℃或更低的温度保存[25]。此外，还可以进行病毒的培养分离，但其检出敏感性低于核酸扩增试验法。

对先天性CMV感染进行准确的产前诊断，需在妊娠期第21～23周抽取羊水进行病毒检测[47-48]。若孕妇在妊娠期前3个月或6个月内发生带状疱疹病毒(VZV)感染，虽然可能在羊水中检测到VZV的DNA，但并不足以表明该孕妇发生了先天性水痘综合征。此外，感染细小病毒B19后无临床症状的比例高达25%，因此，监测羊水中的细小病毒B19有助于临床诊断和产前诊断[48]。

(二)血液

目前，血清、血浆、纯化后的外周血白细胞和外周全血等样本均可用于病毒检测和定量。选取何种血液样本取决于要检测的病毒。对血液样本进行病毒分子定量检测可以有效判断患者预后、评估疗效及病毒耐药性等。要检测随着时间变化的病毒载量，尤为重要的是需使用不变的基质。要检测血样的哪种组分，取决于患者自身情况及后续病毒检测提示需要使用细胞或者非细胞成分[49-52]。

通常，应选取合适的抗凝真空采血管采集3～5 ml血液。如果是儿童样本，采集体积可减少，但不能少于1 ml或2 ml。最常使用的抗凝剂有EDTA、肝素和ACD(枸橼酸盐-葡萄糖-枸橼酸)。可以分离纯化抗凝血样本得到外周血白细胞(见下文)。血浆核酸检测首选的抗凝剂是EDTA和ACD，因为肝素会抑制多种核酸扩增的化学成分[25]。此外，冰冻EDTA抗凝血浆中的核酸稳定性也优于肝素[26]。

在采用全血样本进行病毒核酸扩增时，需去除DNA和RNA聚合酶的抑制剂，如血红蛋白和血红蛋白前体。无论是商业试剂盒还是实验室建立的扩增方法都有很多不同提取方案来去除抑制剂，纯化核酸[25]。在内含喷涂干燥(spray-dried)抗凝剂(EDTA)的试管中的血液，于25℃ 1500 *g*离心20 min可获得血浆。血浆准备管(PPTs；BD，美国新泽西州富兰克林湖)内壁喷涂干燥

EDTA，同时管中还有分离胶，分离胶在血浆和血细胞之间形成物理分界层，简化分离过程。有研究发现，使用PPT进行HIV-1病毒RNA定量检测时，冷冻保存或2～8℃长期保存，会造成离心管中病毒载量的假性升高[53-55]，这可能是由于患者细胞中含有病毒前体DNA[56-57]。这种假性升高，可以通过检测前再次离心或利用只获得RNA的提取方法来避免[58-59]。PPT中的HCV于4℃储存72 h，其RNA水平不会下降[60]。

当需要血清样本进行血清学试验或分子检测时，使用血清分离管[如SST（BDDiagnostics）、Corvac（Medtronic）、Vacuette（GreinerBio-One）]或不含抗凝剂试管采集4～8 ml血液进行分离。血液凝集30 min后，1000～1300 *g*，室温离心10 min。将血清部分转移至无菌管中，于2～8℃下可保存48 h或在－20℃或以下温度长期保存。另外，用于抗体检测的全血，切勿冻存。

进行病毒分离时，静脉穿刺取抗凝（EDTA或肝素）血5～10 ml，于室温下运送至实验室。白细胞分离应在8 h内进行。由于红细胞的毒性作用，全血标本不能直接用于细胞接种。白细胞层也可能含有红细胞。为充分去除红细胞，获得多核或单核细胞进行病毒的接种培养，实验室通常采用密度梯度离心法，并有多种商品化方法[23]。分离得到的白细胞可与二倍体成纤维细胞如MRC-5细胞（试管或玻片培养）、H&V杂交细胞（Diagnostic Hybrids）（玻片培养）[61]共培养，用荧光标记的单克隆抗体直接染色检测（如检测血液中CMVpp65抗原）[62]或提取基因组后利用分子技术检测病毒基因组。研究表明，白细胞起始数量对优化检测性能及保证批间的定量质控极其重要[63-64]。对于CMV的接种培养，玻片病毒培养法比传统试管法更快，且敏感性更高[65]。

（三）骨髓

骨髓检测一般用于鉴别血液系统疾病的病毒病源，包括嗜血细胞综合征、再生障碍性贫血和慢性纯红细胞再生障碍性贫血等疾病[66-67]（表81-1）。采用合适的抗凝管，至少抽取2 ml骨髓。推荐用于NAAT的抗凝剂为EDTA和ACD[25]。尽管阳性诊断率较低，骨髓采集应使用肝素或EDTA抗凝的注射器或真空采血管，并且尽快进行白细胞分离[68-69]。核酸提取前，骨髓标本可置于2～8℃保存。骨髓冻融使红细胞溶解，会释放血红蛋白，该物质会一定程度上抑制核酸的扩增，具体取决于核酸提取的方式和采用的扩增技术[70]。

（四）脑脊液

CSF是用于诊断中枢神经系统病毒感染的重要标本类型（表81-1）。CSF的采集需严格按照无菌要求进行，在左右髂嵴之间，L_4～L_5腰椎间隙进行腰椎穿刺。推荐抽取2～5 ml脑脊液并置于无菌防漏容器中。CSF样本在进行核酸提取前不能够进行离心，因为很多病毒都依赖于细胞存在。无需在脑脊液等无菌体液中加入VTM，因为不需要抗生素处理且转运基质会稀释样本，造成结果假阴性。在运送和保存时，可在2～8℃保存48 h，在－70℃或更低温度可长期保存。由于脑脊液样本中的球蛋白、细胞衍生蛋白和其他不确定物质会抑制PCR中耐热聚合酶的活性，所以在样本检测前，需要进行核酸提取[71-72]。但是也有研究报道，像高温或反复冻融法等简单方法，也可释放核酸[73-74]。在进行病毒分离培养时，如果样本混有明显血液可能影响病毒培养，因为血液中可能含有足够的抗病毒抗体浓度而抑制病毒的生长。在进行接种细胞培养前，脑脊液无须做任何处理。

（五）干血斑

采用干血斑（dried blood spot，DBS）样本进行病毒检测，避免了静脉穿刺，对样本存储温度和运送时间要求也相对宽松。DBS标本已用于HIV诊断和疗效监测、HBV定量和基因分型、新生儿HSV感染诊断和先天性CMV感染检测。虽然与血清检测相比，DBS样本检测的性能尚不稳定，但是DBS标本仍可用于HAV、HBV、HCV、EBV、麻疹病毒和风疹病毒等病毒抗体的检测。一般情况下，纸片干血斑样本仅需采集几滴血液样本就足够后续检测，通常用毛细管指尖采血15～200 μl即可[75]。采集后，至少等待2 h，以便风干血滴。形成干血斑后，标本放入密封袋或容器，并放入足够的干燥剂，以防止样本受潮滋长微生物[25]。DBS标本可在室温下转运和储存，并可以在室温下较长时间保存（与病毒类型有关）或在－20℃或更低温度下长期保存。根据孔径大小（3～6 mm），从DBS卡片上打孔得到的纸片含有

相当于 3.1～12.4 μl 的血液[75]。一旦形成干血斑后，DBS 中的 HIV-1RNA 可在室温或－70℃条件下稳定保存 1 年以上，但病毒活性已丧失[76]。有研究表明，在接受器官移植的患者中，与其血浆中的病毒载量相比，超过 90%指尖采血的 DBS 标本中 CMV 载量的偏差小于 1 个对数值，且在接受抗病毒治疗过程中，2 种标本的 CMV 载量接近[77]。在上述研究中，DBS 标本中 CMV 的 95%检测限约为 2700 拷贝数/ml(675 U/ml)。

(六)眼部

眼部标本主要包括结膜拭子或刮取物、角膜刮取物、玻璃体和房水液。标本采集前，应使用拭子清除结膜分泌物。利用无菌生理盐水湿润的、且有一定弹性的涤纶或人造纤维拭子采集干净结膜上的感染细胞，放入 VTM 中或制备涂片用于免疫荧光染色。AdenoPlus 检测(Rapid PathogenScreening, Inc.，美国佛罗里达州萨拉索塔)是一种检测眼部腺病毒感染的侧流免疫层析法快速诊断试剂盒，通过试剂盒自带的眼部标本采集工具，沾取眼结膜处的液体。该试剂盒检测结果与 PCR 法相比特异性可达到 98%，而敏感性可达 85%[78]。经培训的医务人员可以更好地采集角膜刮取物和角膜拭子并放入 VTM 中。薄涂片可以利用刮取物或拭子标本直接制备，用于免疫荧光染色。通过对玻璃体和房水液进行核酸检测，可以检测视网膜感染的病原，因为此类部位样本较难进行病毒接种和细胞培养。若直接对上述标本进行 PCR 扩增，往往由于标本中存在的蛋白质等因素会降低 PCR 扩增效率[79]，因此，需要对原始标本进行核酸提取。

(七)生殖器部位

造成生殖器感染的最常见病毒是 HSV-1、HSV-2，通常可通过直接抗原检测(direct fluorescent-antibody assay, DFA)、NAAT 或培养方法进行诊断。生殖器溃疡部位的细胞或液体标本与皮肤损伤标本的采集和处理方法类似(见下文)。

检测子宫颈癌高危型 HPV 基因型时[16,18,31,33,35,39,45,51-52,56,58-59,66,68]，一般采用分子生物学方法检测拭子或子宫颈刷采集的子宫颈标本(第 107 章)。用商家特定的体系或 FDA 核准/批准的液体细胞溶液进行标本采集，可同时用于巴氏涂片的制备。新鲜采集的子宫颈活检样本，其横切面大小需至少在 2～5 mm，可采用商品化 NAATs 进行检测。标本采集后都需及时放入到试剂盒标配的标本运输培养基中，并按照说明书要求进行标本的储存、运送和处理。子宫颈阴道拭子或灌洗标本[80-83]及阴茎病变部位拭子[84-85]已被证明均能用于高危型 HPV 感染的有效检测。采集直肠部位标本用于 HPV 病毒检测时，可使用无菌生理盐水湿润的聚酯纤维(dacron)拭子采集，采集后放入液体细胞运输培养基中进行转运[86-87]。

用于 HC2High-Risk HPV DNA 检测试剂盒(Qiagen, Gaithersburg, MD)检测子宫颈刷采集的标本置于标准运输培养基中，可在室温下保存 2 周，2～8℃下可继续保存 1 周，或－20℃保存 3 个月。子宫颈刷若置于 PreservCyt 液基细胞运输培养基中 2～30℃保存 3 个月后，仍可用于 HC2 检测；若是 20～30℃保存 18 周，仍可用于 Cervista(Hologic，美国马萨诸塞州贝德福德)检测；若 2～30℃保存达 6 个月，则仍可用于 COBASHPV(RocheDiagnostics，美国印第安纳州印第安纳波利斯市)检测。当用 Aptima 人乳头瘤病毒(Gen-Probe)检测子宫颈刷中 HPV 感染情况时，子宫颈刷应置于装有 PreservCyt 保存液的 ThinPrep 测试瓶中进行标本的运送，而此时标本通常可在上述液体中 2～30℃保存，保存温度高于 8℃时，其稳定保存时间不可超过 30 天，在－20℃下保存时间可达 24 个月。当进行高危型 HPV 检测时，PreservCyt 保存的标本在检测前不可冻存。使用 cobas HPV(Roche Diagnostics, Indianapolis, IN)检测时，通过 SurePath 保存液(BD Diagnostics-TriPath, Burlington, NC)采集的样本可在 2～8℃下最多保存 6 个月，或 15～30℃下保存 4 周。通过 SurePath 保存液进行采集后使用其他方法进行高危型 HPV 的检测目前还未通过 FDA 的批准。

(八)口腔部位

口腔部位的标本常可通过无创方式获取，并可用于感染的检测，尤其对于某些病毒感染，通过检测唾液中的病毒，可预测其近期感染情况。不同类型的口腔部位标本，包括口腔黏膜细胞(包括口腔损伤部位)、全唾液(whole saliva)、导管腺唾液(取自腮腺、舌下腺和下颌腺)和口腔黏膜渗出

液(oral mucosal transudates,OMTs)等。OMTs标本既可用于病毒的培养,也可用于病毒核酸检测[94]。口腔黏膜细胞常可用拭子或塑料刮刀进行采集;采集后标本应及时置于VTM中送至实验室。采集唾液时可将患者头部前倾,从下唇位置收集唾液至采集管中,并在5 min后继续收集残余的唾液[88]。腮腺部位唾液是诊断腮腺炎的主要标本,通常可用拭子在腮部和牙齿之间、耳朵对应高度的区域擦拭30 s左右[89]。

唾液中主要含有分泌型IgA,而OMTs含有分泌型IgA、IgG和IgM。OMTs(也称龈沟液、龈沟液唾液)由颊黏膜毛细血管及牙齿和牙龈之间的缝隙底部(牙龈缝隙。译者注:龈下腺)产生,通常OMTs可由商品化试剂盒采集,并可在2~8℃下转运至实验室[90]。OMTs已用于麻疹病毒、风疹病毒、腮腺炎病毒、HIV及肝炎病毒的IgM和IgG抗体的检测[91-93]。对于采用口腔液进行HIV和HCV抗体检测时,其标本的处理和检测方法可参考血液样本进行[94-95]。但是,对于HIV感染高风险的患者,特别是在疾病的低发期,不推荐仅采用口腔洗漱液进行HIV抗体检测,应采血样标本进行HIV的检测[95]。

唾液样本也可采集进行病毒培养和NAAT,主要应用于新生儿的先天性CMV感染的评估。在此背景下,唾液和尿一样都能够通过快速培养和NAAT进行先天性CMV感染的诊断[96]。

(九)呼吸系统

导致上呼吸系统(upper respiratory tract,URT)和下呼吸系统(lower respiratory tract,LRT)感染的病毒可通过Ag、培养和NAAT的方法进行诊断(表81-1)。理想条件下,相关诊断检测应该在一定时间内完成(通常为24 h),从而使结果用于患者的管理[97]。

很多呼吸系统病毒的主要复制部位是后鼻咽纤毛上皮细胞,其次是前鼻孔和口咽部。多数病毒在鼻和咽部浓度较低,因此,鼻和咽部标本通常并不特别适合用于病毒检测。不过,此类标本可用于敏感性较高的NAAT法,或者当免疫缺陷患者采用其他有损伤的标本采集方法有出血风险时,采用此类标本。

进行鼻咽抽吸液采集时,将一个狭窄的导管或管子通过鼻孔插入鼻咽部。将黏液收集器或注射器连接到另一端,一边吸一边慢慢退出鼻孔。导管中的残余液体,可加入VTM或无菌生理盐水冲洗至收集器或注射器中[22-23]。采集鼻咽洗液时,利用连有注射器或真空管的导管,向鼻腔中注入几毫升无菌生理盐水进行灌洗。将灌洗液通过导管上注射器或真空管转移至含有VTM的试管或无菌容器内。与鼻咽拭子、鼻咽吸取物和鼻咽部刮取物等比较,鼻咽洗液具有较高的呼吸系统病毒核酸检测阳性率,而且采集过程中患者极少有不适感[98]。

用于呼吸系统病毒检测的拭子材料应该为聚酯纤维、涤纶或人造丝,柄部应为塑料或铝。木柄的拭子可能含有对培养细胞有害的物质。藻酸钙拭子会影响有包膜病毒的活性,干扰荧光抗体检测及抑制某些NAAT,应避免使用。植绒拭子,由尼龙纤维经专有的喷雾技术制成,尤适于标本的吸收和释放,能比传统人造纤维拭子收集更多的呼吸系统上皮细胞,用于DFA法检测呼吸系统病毒[99-100]。中鼻甲植绒拭子设计为圆锥形、带有采样深度指示、其尼龙纤维的长度和直径更大,以采集更大面积的呼吸系统黏膜表面,包括下、中鼻甲。此类拭子可自行采集,能收集到与鼻拭子和鼻咽拭子类似量的呼吸系统上皮细胞;在儿童,进行常见呼吸系统病毒的DFA检测时,鼻咽抽吸液更容易接受[101-102]。与尼龙和涤纶拭子相比,聚氨酯泡沫拭子更适合用于在采集过程较易出血患者的鼻前孔标本采集。在免疫低下的患者中,与其鼻咽洗液标本相比,可自行采集的泡沫头鼻拭子标本在进行呼吸系统病毒NAAT上具有更高的敏感性,在儿童呼吸系统病毒感染的病毒抗原快速检测上,效果也比尼龙拭子更佳[103-104]。

通常后鼻咽部的拭子所能蘸取的病毒量高于前鼻或咽部拭子所能沾取的量。将柔软、细尖的拭子由鼻腔插入,沿鼻腔壁伸入鼻咽部直至感觉到一定阻力时,转动数次,然后将该拭子取出,置入VTM中[23]。采集时,拭子应朝向耳朵方向,而不是向头顶方向,并达鼻腔和耳廓间距的一半。对DFA检测或病毒核酸检测而言,相比鼻咽洗液或鼻咽吸取物标本,用植绒鼻咽拭子采集的呼吸系统病毒标本,其病毒检出敏感性更高[105-106]。一般情况下,并不单独选用咽拭子标本用于诊断上呼吸系统感染,与鼻咽拭子或鼻咽吸取物进行联合检测分析可提高呼吸系统感染的病原检出

率[105,107-108]，也可检测或合并其他类型的呼吸系统标本。咽拭子采集标本时，需用压舌板压住患者舌部，用拭子彻底擦拭扁桃体和后咽部位。

虽然通常口咽部和鼻咽部是病毒进入呼吸系统的门户，上呼吸系统中能否检出病毒，并不作为诊断患者是否发生下呼吸系统感染的依据，因为在某些严重的流感病毒感染患者，其上呼吸系统部位流感病毒检测结果为阴性，而却能在下呼吸系统中检测到病毒存在[109-110]。同样，严重急性呼吸综合征（severe acute respiratory syndrome，SARS）和中东呼吸综合征（Middle East respiratory syndrome，MERS）冠状病毒在下呼吸道的检测比上呼吸道更加敏感[111]。收集支气管肺泡灌洗液是将纤维光束支气管镜插入涉及的支段，灌注无菌生理盐水后，抽取灌洗液标本。用于核酸检测的支气管肺泡灌洗液标本采集后，需在 24 h 内完成标本的运送和检测，此类标本可在 4℃下储存 72 h，或者在 −70℃及以下温度冻存用于后续检测[25]。虽然痰不是特别有价值的用于病毒分离的标本，不过也经常采集痰标本，因其易于采集，并可用于其他微生物检测。痰适于进行呼吸系统病毒的 NAATs[112]，且已有研究发现，痰标本有助于提高成人呼吸系统疾病的诊断率，超过鼻拭子和咽拭子标本联合诊断[113]。然而，对于有影像学依据的儿童肺炎患者，使用诱导痰进行呼吸道病原体 NAAT 在诊断价值方面有限[114]。更进一步，若在痰标本中检测到病毒，并不能完全表明患者发生了下呼吸系统感染，因为该病毒也有可能来源于口咽部。拟进行 NAATs 的痰标本应置于无菌容器，室温 30 min 内运送至实验室，如果运送时间超过 30 min，则需在 4℃条件下进行运送[25]。

呼吸系统部位的液体标本（如鼻咽抽吸液和鼻洗液）或保存于 VTM 中的鼻咽拭子用于病毒细胞培养时，应对标本进行充分振荡，以使黏附在细胞表面的病毒与细胞分离，并 500～1000 *g* 转速下离心 10 min，若标本中细胞碎片极少，则此步骤可省略。离心后的上清则可以直接用于病毒接种或进一步过滤（0.45 μm 孔径滤膜）去除其中的细菌、真菌和（或）细胞碎片。沉淀后的细胞（PBS 缓冲液洗涤 2～3 次）可用于免疫荧光染色（immunofluorescent，IF）[22-23]。沉淀后的细胞若采用细胞离心涂片机进行涂片，可提高免疫荧光染色的敏感性，并减少样本中不合格标本数量[115]。离心或过滤后的标本一般不再用于抗原检测或核酸分析，因为此类检测的标本不会受到微生物污染的影响。宿主细胞的丢失可能影响 Ag 和 NA 检测的敏感性。

呼吸系统标本中的黏液会对抗原检测造成显著影响。当进行 DFA 时，黏液会抑制细胞黏附到玻片，并产生非特异性荧光。黏液还会阻碍样本的过滤。一般可通过小孔径移液器反复吸取样本，有效去除样本中的黏液。

（十）皮肤

病毒感染后会导致多种不同的皮疹，如斑丘疹、出血点和水疱等。从斑丘疹和点状出血性皮疹获取病毒需要进行组织皮肤活检，一般不常开展。病毒引起的传染性疾病中，若产生斑丘疹、点状皮疹等症状，通常根据临床表现和其他非皮肤标本的检测来识别；通常取血样进行血清学或核酸检测（表 81-1），因为感染后的宿主免疫反应，病毒通常不在这些病变组织中[116]。

水疱性病变常由 HSV、VZV 和肠道病毒感染引起。选择新形成的水疱处的组织液和细胞，而不是脓疱、溃疡和结痂处，因为这些部位的病毒载量通常不足以进行后续抗原检测、核酸检测或病毒培养。水疱液可选用毛细管、注射器采集或无菌拭子擦拭后置入 VTM 中。水疱如未发生破裂，可采用装有 26 G 或 27 G 针头的 1 ml 注射器抽取水疱中的液体。在采集水疱液前进行皮肤清洗和消毒时，碘伏和酒精可能会导致病毒灭活。因此，要在标本采集后进行局部消毒。及时将注射器抽吸的液体冲洗收集到 VTM 中。此外，还可用注射器或无菌手术刀片将水疱刺破后，用无菌拭子沾取渗出的水疱液，再将拭子放入 VTM 中。应快速擦取病变的边缘和底部，获得感染的上皮细胞[22]。而对于溃疡或结痂（需先将结痂去除）皮肤部位的细胞，可通过在同一部位反复滚动拭子来采集。在取样过程中应避免取样部位出血，因为血液中的中和抗体会影响后续的病毒分离培养。可在床边制备免疫荧光染色涂片（如 HSV 和 VZV），在洁净的玻片中央，将标本推成薄涂片。等室温干燥后，将玻片用丙酮固定 5～10 min 后，再进行免疫荧光染色。此外，拭子和保存于 VTM 中的水疱液都能用于 NAATs、抗原检测

和(或)病毒培养。当进行病毒培养时，标本可振荡后直接接种或离心和过滤后(如果有细胞碎片)直接接种培养。

(十一)粪便标本和直肠拭子

粪便是检测消化道病毒感染的最佳标本。许多消化道感染的病毒(如轮状病毒)不能进行病毒培养，需要抗原或核酸检测来进行诊断。理想情况下，应在患者发病 2～4 天内采集标本，因为多数患者在感染后期的病毒检出率降低，除非患者有基础性疾病导致排毒时间延长。不过，大部分肠道病毒在患者症状消失数周后，仍能在粪便中检出。

收集 2～5 ml 水样便或 2～5 g 成形便至洁净、干燥、防泄漏容器或 VTM 中，具体由后续检测类型决定。若无法及时进行检测，新鲜的粪便标本可在 4℃保存 2～3 天。长期储存需要在－70℃或更低温度下保存。特制的纸条现已用于粪便样本的采集、运送和储存，用于后续对轮状病毒、40 和 41 型腺病毒、诺如病毒的核酸检测[43-44,117]。一般认为直肠拭子不及粪便，因其所携带的标本量较少；直肠拭子标本的作用与取样时所能采集的粪便量有关。进行直肠拭子取样时，将拭子从肛门处插入直肠数厘米，转动拭子数秒后，取出，置于 VTM 中。

细菌在粪便中占相当比例，需对粪便样品进行离心、过滤或者 2 种方法皆进行，以防止细胞培养时造成微生物污染。在进行粪便样本的病毒分离时，将粪便加入含有抗菌药物和玻璃珠的 VTM 中，制备成 10%～20%(wt/vol)粪便悬液，振荡 1 min 后，3000 *g* 转速离心 15～30 min。取上清经 0.20～0.45 μm 除菌滤膜过滤除菌后，用于病毒接种细胞培养[22-23]。

(十二)组织(活检或尸检)

在手术过程中或在尸检中采集的组织标本可以用多种诊断方法检测。肺、肝、淋巴结、肾、脾、心脏和脑组织可用于多种临床综合征的病毒病因学检测(表 81-1)。由于通常组织标本采集会造成患者一定损伤，因此，必须确保采样时候一次收集足够的标本用于后续所需的检测；否则，临床医生可以确定检测的优先顺序。经与病理医生讨论哪一部分标本用于病毒诊断后，可在实验室切分组织标本[118]。从损伤区域的边缘部位取下小块组织保存于无菌容器中，若后续需要进行微生物学和组织学检测，需要保持样本湿润，一般加入无菌生理盐水。福尔马林固定后的组织不适合用于病毒分离，也可能会影响 NAAT，尽管有过成功从福尔马林固定后组织中检测出 DNA 和 RNA 的报道[25,119-121]。通常可将细胞制成压片，待室温干燥后，将玻片插入丙酮固定后可用于后续细胞的染色。

若需进行组织块的核酸提取，则采集后的组织块应保存于无菌生理盐水中以保持样本湿润或直接放置于适合的核酸保存液中。组织中核酸样本的稳定性与组织类型有关，在将组织运送至实验室过程中，应将组织置于冰上或冻存后运送[25]。当用新鲜组织样本进行核酸提取时，需先将组织剪碎，用蛋白水解酶处理后，再进行核酸提取。若是福尔马林固定后的石蜡包埋组织样本中的核酸提取，组织样本应在室温下存放和运送，脱蜡后，再进行核酸提取。不过，由于福尔马林固定后会导致核酸降解，新鲜组织样本更适于核酸提取[25]。另外，对于组织样本的病毒分离操作而言，通常是将组织在 VTM 中剪碎后无菌匀浆，制备 10%～20%(质量浓度)组织匀浆[22-23]。组织匀浆可在 600～900 *g* 转速下离心 10 min 或静置一段时间，将上清用于病毒接种培养。

(十三)尿

当患者发病后或首先怀疑有先天性或围产期感染时，应尽早收集尿标本。一般情况，收集 5～10 ml 尿(中段尿或导尿管采集)至无菌容器中，不必加入 VTM。目前有关采集时间是否会影响尿检测结果还尚未完全明确。进行 NAATs 时，应尽可能避免常温储存未能及时处理的尿样本，因为其低 pH 及含有的高浓度尿素会很快导致核酸变性[25]。在检测前要提取核酸，因为尿中含有抑制 PCR 反应的成分[122-124]。用于核酸提取的尿标本可经过滤纸片过滤，也可不经纯化或洗脱步骤，用蘸有尿的滤纸片直接进行 PCR 扩增[125-127]。

在细胞实验前，尿样本可经滤膜过滤(滤孔尺寸 0.45 μm)或 1000 *g* 转速离心 10 min，去除细菌和细胞碎片；可通过加入碳酸氢钠(7.5%的溶液)中和 pH，来降低其毒性作用[23]。另外，也可在尿中直接加入抗生素或用 VTM 稀释，来中和

pH 并达到除菌的目的[22]。上述混合液体还需在室温条件下静置 15 min 后，方可用于后续细胞培养试验。

七、标本运送规则

标本采集后常运送至参考实验室或公共卫生实验室。所有含有感染性物质的包装必须符合各组织或机构的装运规定。在美国，管理标本和生物制品运送的部门主要是美国交通部（Department of Transportation，DOT）。而国际航空运输协会（International Air Transport Association，IATA）主要负责所有空运货物的管理，并制定了自己的《危险品规定》（Dangerous Goods Regulations，DGR）[128]。因为国家和国际监管机构之间需要协调，通常各个规定均可接受国际航空运输协会的要求。

DGR 包括对生物和感染性物质运输的包装和标记的特定说明，如患者的标本或培养的微生物[128]。对于临床实验室而言，要运送的标本一般可归入下面 3 类中的一类：豁免的人类标本、A 类或 B 类。A 类感染性物质（UN2814 感染性物质，感染人类）是指运送的标本一旦发生暴露感染，可能危及人类生命（如埃博拉病毒）。A 类中所列的微生物种类可在 www.phmsa.dot.gov 网站查询到。不符合 A 类的感染性物质，就可归到 B 类（UN3373 生物制品，B 类），除非该标本含有病原的可能性极小，这种情况下可归到豁免人类标本中。

运送任何 A 类感染性物质的包装必须包含一个内层容器、一个内容清单和一个外层包装。内包装必须包含一个或多个防漏主容器和至少能够承受 95 kPa 内压的防漏二级包装。运送液体标本时，在主容器和二级包装之间，必须要放入足够吸附所有液体的吸附性材料。B 类包装与 A 类包装基本相同，但不需要放置申报清单。对已列入豁免清单的患者标本，在有足够强度的外层包装中，放入防漏主容器和二级容器。对员工进行的危险品包装和运输培训必须记录在案，每 2 年需要换证。DOT 可随时对危险品收件人或寄件人进行突击检查。

八、总结

正确的标本采集和处理方法对确保实验室结果的正确非常重要，实验室必须为临床医生正确的采集标本和运送标本提供依据。在某些情况下，由生产商来确保正确进行标本采集、运送和处理操作，而对采用内部研发的方法进行检测的实验室，在进行常规临床标本检测前，要自行对检测前因素进行验证[45]。

病毒诊断检测的效果（敏感性、特异性、阳性预测值和阴性预测值）很大程度上取决于病毒的完整性或标本中所含的宿主成分的干扰。当采用分子生物学技术进行病毒检测时，检测能否成功主要取决于所提取的标本中的核酸质量。从患者采集标本后，如何将标本保存并运送到实验室，将会直接影响所提取的核酸的质量。当进行病毒抗原检测分析时，需要在感染部位收集足够量的完整细胞，并注意保存，避免标本的降解。血清学试验受相关疾病进程中标本采集时间的影响。为成功分离获得病毒，需要保证病毒的活性，通过以下几点可以提高病毒分离成功率：①优化标本采集时间和方法，提高病毒滴度；②避免标本被热灭活或风干；③采用高效的运送体系。

参考文献请扫二维码查阅

第82章　试剂、染色法、培养基及细胞培养：病毒学

GERALD A. CAPRARO，CHRISTINE C. GINOCCHI

（喻华　译；钱渊　审校）

1913年，为了疫苗生产的目的，第一次将痘苗病毒通过细胞培养的方式来增殖[1]。然而，直到1949年，Enders等[2]首次描述运用培育的哺乳动物细胞和观察细胞病变效应（cytopathic effect，CPE）来检测脊髓灰质炎病毒（polioviruses），细胞培养在临床诊断中的潜在作用才得以显示出来。如今，活细胞已运用于支持许多细胞依赖型生物的生长，这些生物包括病毒和特定细菌如衣原体属（*Chlamydia* spp.），偶尔用于支原体属（*Mycoplasma* spp.）。此外，培养的细胞可以用来展示细菌毒素效应，这些毒素分泌自病原体例如沙门菌属（*Shigella* spp.），包括O157：H7在内的产毒型大肠埃希菌（*Escherichia coli*）和产毒型艰难梭菌（*Clostridium difficile*）。病毒与不同的动物、人类和（或）昆虫细胞之间的反应还依赖于传统的试管培养法和快速细胞培养法（例如，离心小管），这些方法应用在为培养、鉴定和收集完全的致病病毒而建的标准实验室中[3-4]。

在运用分子检测和定量病毒病原的时代，病毒分离的适用性已受到质疑。已经有大量的文献证实，许多病毒可以首选分子检测方法，是因为：①高敏感性；②快速检测和出报告的可能性（数小时相对于过夜，或者数天相对于数周）；③可以更准确定量标本中现存的病毒量；④在一些情况下，由于高致病病毒培养可能引起实验室感染的风险（例如，天花病毒、埃博拉病毒和禽流感病毒）。但是，细胞培养法在下述情况下是有用的：①潜在的病毒病原未知；②其他检测方法费用远高于细胞培养；③用于记录活动性感染；④抗病毒药物敏感性试验；⑤通过测定存活病毒来得知抗病毒疗效；⑥对病毒株的血清学分型；⑦疫苗及治疗方法的临床试验；⑧尚未能开展分子检测方法的实验室。某些作为临床报告目的的分子方法，可能和细胞培养一样需要过夜，但不像细胞培养一样可用作单个样本检测。因此，细胞培养仍旧是不可或缺的研究及临床实验室的手段，尤其是与高特异性单克隆抗体（monoclonal antibodies，MAbs）联合运用于常见病毒和衣原体检测时，或者是用于基因工程改造过的能够产生由病毒诱导的酶的细胞株[5]，如β-半乳糖苷酶用于单纯疱疹病毒（herpes simplex virus，HSV）检测[6]。

本章描述了与传统的试管培养法和快速病毒培养技术有关的细胞系、试剂、染色和培养基，所包括的范例是可能用到培养法的病毒病原体，既有已经研究得很清楚的病毒也有新发现的感染性病毒病原体。至于对某一个或者某些类特定病毒的标本采集、样本处理过程及培养的要求会在相应的章内讨论。涉及细胞培养技术的全面的综述[7]和临床和实验室标准委员会（Wayne，PA）提供的参考文献M41-A可供读者参考。M41-A提供了病毒培养方法指南，其中包括所要求的可操作性的生物安全防护方法[8]。一个由美国疾病控制和预防中心（Centers for Disease Control and Prevention，CDC）提供的病毒学服务的明细目录和可下载的实验方法可以在CDC的网站上找到（https://www.cdc.gov/laboratory/specimen-submission/list.html）。本章附录列出了贯穿本章中提及的细胞株、培养基和试剂的生产商和供应商。

一、试剂

（一）平衡盐溶液（Hanks and Earle液）

Hanks平衡盐溶液和Earle平衡盐溶液

(EBSS)是2种最普遍使用的配方。但是,Hanks液对 CO_2 缓冲能力更好,EBSS对环境空气缓冲能力更好。

(二)密度梯度培养基

密度梯度培养基或细胞制备管(BD,Frank-lin Lakes,NJ)均用于外周血单个核及多形核淋巴细胞的分离。分离后的细胞可利用免疫染色的方法直接检测病毒,如巨细胞病毒(cytomegalovirus,CMV)。关于密度梯度培养基或细胞制备管使用的详细描述和商品化来源在第79章列出。

(三)Dulbecco磷酸缓冲盐

Dulbecco磷酸缓冲盐(phosphafe-buffered saline,PBS)是一种包含有丙酮酸钠和葡萄糖的维持型培养基。

(四)HEPES

HEPES是一种两性离子的有机化学缓冲剂,与碳酸氢盐缓冲体系不同的是,尽管二氧化碳浓度变化,这种两性离子的有机化学缓冲剂仍可维持生理性的pH。HEPES被广泛使用于培养基中。

(五)细胞保存用福尔马林

福尔马林可用来保存用于教学及科研目的的细胞培养中病毒的细胞病变效应(CPE)。

Earle基础培养基 ························ 81 ml
甲醛(浓度37%~40%)················ 30 ml

将CPE阳性的培养物管内注满福尔马林溶液,密封后室温保存。

(六)生理盐水

0.85%生理盐水常用作稀释液。

(七)10×庆大霉素-两性霉素B溶液

一些不同的抗菌药物与两性霉素B组合加入运输培养基,尤其是用于标本预处理如培养接种前大便标本的处理,或者在换液时用于控制细菌和真菌污染。有含适宜抗菌力的抗菌药物和两性霉素B的商品化培养基已可购买到。10×庆大霉素-两性霉素B溶液也可以在实验室以1∶10比例添加到待处理样品中(每1.0 ml待处理样品中加入0.1 ml 10×庆大霉素-两性霉素B溶液)。特别需要注意的是,抗生素对于抑制病毒培养基中细菌和真菌污染的效能受到标本来源地环境中抗菌药物耐药水平的影响。实验室可能会观察到污染率的增加,这是由于患者样本中的细菌和酵母菌变得更加耐药。尽管如此,好的质量控制措施仍然要求在运送培养基中添加抗菌药物。实验室收到含有标本的运输培养基后,离心可对去除标本液中的杂质和细菌、真菌的污染有帮助,但离心并不总是必需的。标本上清液接种于适宜的细胞系中。

Eagle基础培养基(EMEM) ··········· 89 ml
庆大霉素(50 mg/ml) ····················· 1 ml
两性霉素B(250 μg/ml) ··············· 10 ml

将上述物质混匀,分装成适合使用的小管,冻存于−70~−20 ℃环境中。

(八)胰酶溶液

为了细胞传代,以及用于结合于细胞的病毒[如腺病毒、CMV和水痘-带状疱疹病毒(VZV)]的免疫染色,胰蛋白酶溶液可替代细胞刮取法,用于分散细胞管或培养板孔中贴壁的单层细胞。用PBS或EDTA配制成的2.5%胰蛋白酶溶液已商品化。

(九)吐温20-PBS

吐温20-PBS,最常用的工作浓度是0.02%,pH4,可用于荧光标记的单克隆抗体(MAbs)进行免疫染色前洗涤细胞单层,但并非总是必需这样做。使用商品化染色试剂时要按照说明书来进行特定染色。吐温20-PBS于室温保存,一旦溶液变浑浊或有沉淀产生时应当丢弃。

二、病毒学染色

用一些方法直接检测临床标本可提供相对快速的结果,这些方法包括对未经固定的手术切除物或活检组织的玻片压片法、组织刮取物的细胞学检查(如Tzanck方法检测HSV)、黏膜刮取物的涂片(如HSV或VZV检测)、通过细胞离心涂片器(cytospin)或离心浓集样本(如呼吸道病毒检测)。涂片可床旁制备(如皮肤刮片检测HSV或VZV)或实验室制备(如运输培养基运送的呼吸道

拭子），然后根据所用的方法用 80%～100% 浓度的纯级丙酮、95% 乙醇或其他细胞固定剂进行涂片的固定。

传统的苏木素-伊红和瑞氏-吉姆萨染色方法可显示特征性的细胞形态，例如，"猫头鹰眼"细胞核内包涵体提示 CMV，含有大的嗜碱性包涵体的"破碎细胞"符合腺病毒感染。如今对一些病毒和衣原体主要采用异硫氰酸荧光素（fluorescein isothiocyanate，FITC）、异硫氰酸甲基若丹明、藻红蛋白等荧光素标记的单克隆抗体，结合伊文蓝（Evans blue）和（或）碘化丙啶（propidium iodide，PI）复染对临床标本直接进行鉴定，可在 15～60 min 获得结果。此外，直接荧光抗体（diret fluorescent-antibody，DFA）或间接荧光抗体（indirect fluorescent-antibody，IFA）试验可用于从细胞培养中分离的病毒的确认，以及采用离心增强方法分离的病毒的盲染试验（该内容将在下面章节进行讨论）。最基本的设备（孵育箱、荧光显微镜、移液器和离心机）和适度的专业技术是需要的，以便完成试验和结果解释[7]。

表 82-1 为美国 FDA 准许的用于体外诊断试验的商品化试剂，这些试剂常常以工作浓度提供，并已通过了质量的试验来保证其敏感性和特异性。一些试剂被批准可用于标本的直接检测或培养物的确证试验，有些情况下两者皆可用。有各种不同组合的单克隆抗体可用作免疫荧光染色法：①检测衣原体（图 82-1）或衣原体属，但是不能进行区分；②识别单种病毒（图 82-2）；③检测并区分 2 种或 2 种以上的病毒（图 82-3）；④识别单个病毒，并且含一个多种单克隆抗体的混合试剂可识别多种其他的病毒，但不能进行区分（图 82-4）；⑤通过混合的单克隆抗体检测同一科的病毒或多个病毒，但不能进行区分（图 82-5）。荧光染色位置（如细胞质或是细胞核染色）及染色的模式（如斑点型或均匀型）都可以帮助区分病毒种类（图 82-3）。

表 82-1　商品化 DFA 和 IFA 衣原体和病毒检测试剂[a]

检测目标[b]	用途（按照制造商）	制造商和试剂盒（实验名称）
衣原体属	CC	Trinity Biotech；Bartels 衣原体 CC FA 检测试剂盒（在美国未使用）
沙眼衣原体	CC	Trinity Biotech；微量培养板沙眼衣原体 CC 确认试剂盒
沙眼衣原体	DSD	Trinity Biotech；MicroTrak 沙眼衣原体直接标本检测试剂盒
衣原体属	CC	Bio-Rad；Pathfinder 衣原体培养确认系统
沙眼衣原体	DSD	Bio-Rad；Pathfinder 沙眼衣原体 DFA 检测试剂盒
衣原体属	CC	Quidel/ D^{3}DFA 衣原体培养确认试剂盒
衣原体属	CC	Meridian；Merifluor 衣原体
沙眼衣原体	DSD	Remel PathoDX 沙眼衣原体 DFA 检测试剂盒
衣原体属	CC	Remel PathoDX 衣原体培养确认试剂盒
CMV	DSD	Millipore；Light Diagnostics CMV pp65 抗原血症 IFA 试剂盒（RUO）
CMV	CC	Millipore；Light Diagnostics CMV DFA 试剂盒
CMV	CC	Millipore Light Diagnostics CMV IFA 试剂盒
CMV	CC	Quidel；D^{3}DFACMV 即时早期抗原鉴定（ID）试剂盒
CMV	DSD 和 CC	Trinity Biotech；Bartels CMV 荧光单克隆抗体检测试剂盒
CMV	CC	Trinity Biotech；BartelsCMV 即时早期抗原（IEA）间接荧光抗体检测
肠道病毒	CC	Millipore；Light Diagnostics 肠道病毒通用 IFA
肠道病毒群	CC	Millipore；Light Diagnostics 肠病毒筛查 IFA
肠道病毒	CC	Quidel；D^3 IFA 肠道病毒 ID 试剂盒
肠道病毒	CC	Remel Imagen 肠道病毒
HSV-1/2 检测	DSD 和 CC	Millipore；Light Diagnostics SimulFluor HSV 1/2 试剂盒
HSV-1/2 和 VZV 检测	DSD 和 CC	Millipore；Light Diagnostics SimulFluor HSV/VZV 试剂盒

（续 表）

检测目标[b]	用途(按照制造商)	制造商和试剂盒(实验名称)
HSV 种	CC	Quidel；D^3 HSV 鉴定
HSV-1/2 分型	CC	Quidel；D^3 HSV 分型
HSV-1/2 分型	CC	Quidel；ELVIS HSV 鉴定及分型
HSV-1/2 检测和分型	CC	Remel；Imagen 单纯疱疹病毒检测
HSV 检测	CC	Trinity Biotech；BartelsHSV 荧光单克隆抗体检测试剂盒
HSV-1/2 检测和分型	CC	Trinity Biotech；BartelsHSV 型特异荧光抗体检测分型试剂盒
HSV-1/2 检测和分型	CC	Trinity Biotech；MicroTrak HSV1/HSV2 培养物鉴定/分型试验
HSV-1/2 检测和分型	DSD	Trinity Biotech；MicroTrak HSV1/HSV2 直接样本鉴定/分型
VZV	DSD 和 CC	Meridian；Merifluor VZV
VZV	DSD 和 CC	Millipore；Light Diagnostics VZV DFA 试剂盒
VZV	CC	Quidel；D^3 VZV ID 检测
呼吸道组合 B	DSD 和 CC	Trinity Biotech；Bartels 呼吸道病毒筛查和鉴定试剂盒
RSV	DSD 和 CC	Trinity Biotech；Bartels RSV 直接荧光抗体检测
呼吸道组合 B	CC	Millipore；Light Diagnostics SimulFluor 呼吸道病毒筛查
呼吸道组合 B	CC	Millipore；Light Diagnostics 呼吸道病毒 DFA 筛查鉴定试剂盒
呼吸道组合 B	CC	Millipore；Light Diagnostics 呼吸道病毒组合 Ⅰ IFA 筛查/鉴定试剂盒
流感病毒 A 和 B	DSD 和 CC	Millipore；Light Diagnostics SimulFluor Flu A/B IFA
副流感病毒 1、2/3	CC	Millipore；Light Diagnostics SimulFluor Para 1、2/3
副流感病毒 1、2、3、腺病毒(dual)	CC	Millipore；Light Diagnostics SimulFluor Para 1、2、3/Adeno
RSV/流感病毒 A(dual)	CC	Millipore；Light Diagnostics SimulFluor RSV/Flu A
RSV/副流感病毒 3(dual)	CC	Millipore；Light Diagnostics SimulFluor RSV/Para 3
呼吸道组合 A/鉴定	DSD 和 CC	Quidel；D^3 Fast Point L-DFA 呼吸道病毒鉴定试剂盒
流感病毒 A 和 B	DSD 和 CC	Quidel；D^3 Fast Point L-DFA 流感病毒 A/B 鉴定试剂盒
RSV 和 HMPV	DSD 和 CC	Quidel；D^3 Fast Point L-DFA RSV/MPV 鉴定试剂盒
呼吸道组合 B/鉴定	DSD 和 CC	Quidel；D^3 Ultra 筛查及鉴定试剂盒
呼吸道组合 C(dual)	DSD 和 CC	Quidel；D^3 Duet FluA/呼吸道病毒筛查及鉴定试剂盒
呼吸道组合 D(dual)	DSD 和 CC	Quidel；D^3 DuetRSV/呼吸道病毒筛查及鉴定试剂盒
HMPV	DSD 和 CC	Quidel；D^3 MPV
呼吸道组合 B 联合	DSD 和 CC	Remel；Imagen 呼吸道病毒筛查
流感病毒 A 和 B	DSD 和 CC	Remel；Imagen 流感病毒 A 和 B
副流感病毒组	DSD 和 CC	Remel；Imagen 副流感病毒组
副流感病毒分型	DSD 和 CC	Remel；Imagen 副流感病毒分型
RSV	DSD	Remel；Imagen RSV

注：[a] 根据制造商网站提供给食品药品监督管理局(FDA)的资料及试剂在体外诊断中的地位，尽管试剂的用途在制造商网站上给予了建议，但并不是所有建议的临床应用都已获得制造商的验证。adeno. 腺病毒；CC. 培养分离后确认；DSD. 样本直接检测；dual. 2种荧光染色法；FluA. 流感病毒 A；ID. 表鉴定；IF. 免疫荧光；Para. 副流感病毒。[b] 呼吸组合 A：腺病毒，流感病毒 A 和 B，副流感病毒 1、2 和 3，呼吸道合胞病毒和偏肺病毒；呼吸组合 B：腺病毒，流感病毒 A 和 B，副流感病毒 1、2 和 3，呼吸道合胞病毒；呼吸组合 C：腺病毒，流感病毒 B，副流感病毒 1、2 和 3，不同流感病毒 A 的鉴别鉴定；呼吸组合 D：腺病毒，流感病毒 A 和 B，副流感病毒 1、2 和 3 呼吸道合胞病毒的鉴别

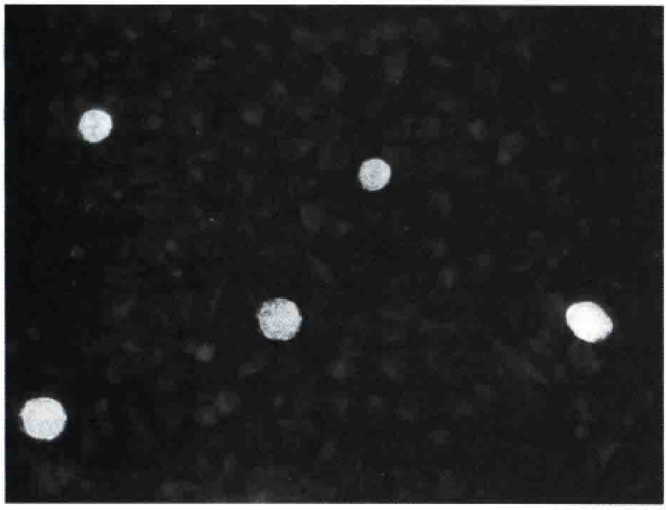


图 82-1 免疫荧光方法检测 McCoy 细胞中的沙眼衣原体。放大倍数为 200 倍，(由 Quidel 提供)，见彩插

三、细胞培养法

具有 GMP(good manufacturing practices-regulated)资质的供应商(见附件)提供的组织培养细胞是无菌、具有稳定合适的 pH、非常彻底地测试了对常见病原体的易感性、且无潜在内源性有害物质(如泡沫病毒和支原体)的污染，以排除这些有害物质对病原体检测的干扰。下订单 1～2 天后，供应商就可提供长成单层的、即时可用的细胞，保证实验的使用。培养的细胞以一系列随时可用的(ready-to-use formats)方式来供应(即已将细胞传在各种培养器皿中，买回去即可使用)，包括 16 mm×125 mm 圆底螺旋口玻璃管、微量小瓶(shell vials)或培养板。买来的细胞有它自己的生命时间，根据细胞株类型及客户想要分离的病原体的出现的时间，生产商用几天或几星期来定义。某些细胞以冻存于离心小管的形式供应，可在－70 ℃或低于－70 ℃的条件下保存数月或数年，使用时进行简单的融化后，换了培养基即可进行培养。另外，将一些冻存细胞标明细胞数(密度)保存于冷冻管和其他容器中，需要由购买细胞的实验室根据细胞的使用目的，在细胞瓶、多孔培养板、离心小瓶或试管中传代后获得单层细胞[9]。冻存细胞可在需要时使用，也可用于应对一些突发情况，如标本量的突然增加、突发性病毒疾病的暴发流行或细胞运送延迟等。

某些可能需要一些尚未商品化的特殊细胞的实验室，有时可以从科研性的实验室或美国典型培养物储存中心(American Type Culture Collection，ATCC)(Manassas，VA)获得，然后在用户自己的实验室进行传代增殖。收到细胞后，实验室必须确认培养的细胞无菌、无支原体污染、合适的细胞代数或可复制的代数来保证病毒或衣原体分离的敏感性。细胞培养必需在适宜的环境中进行，以保证适合细胞的增殖，满足后续实验的需要[10]。很多文献详细描述了冻存细胞和新鲜细胞扩增的过程[4,8]，本章不再赘述。

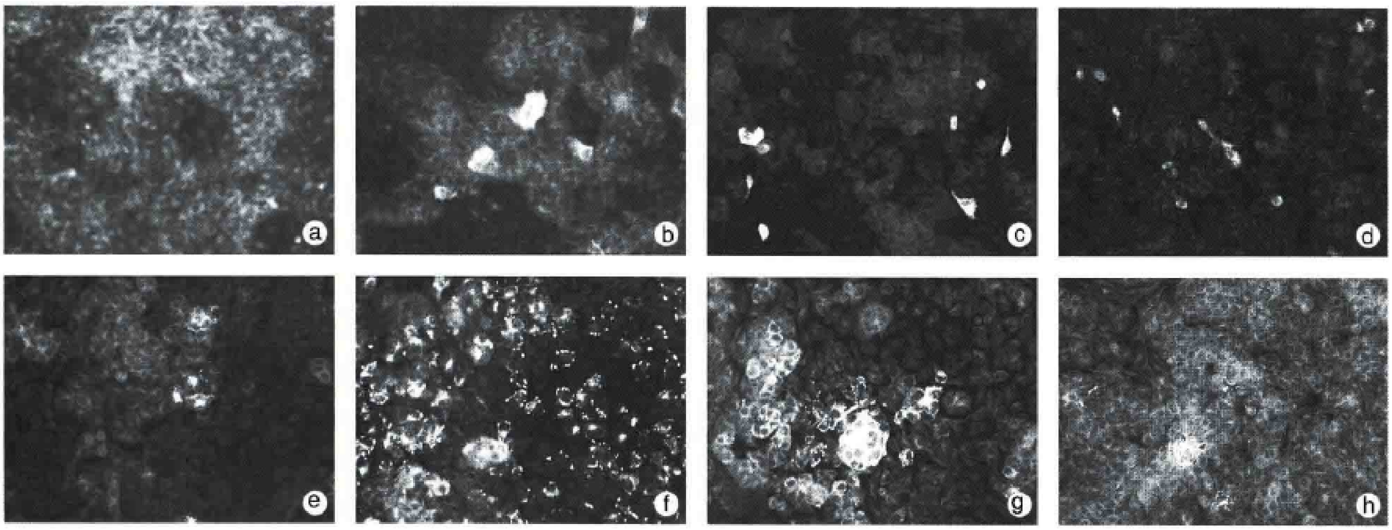


图 82-2 使用 D3Ultra Kit reagents (Quidel)免疫荧光方法检测 R-Mix 细胞中呼吸道病原体

注：a. 未接种的 R-Mix 细胞(译者注：即未接种病毒或标本的正常细胞对照)；b. 腺病毒；c. A 型流感病毒；d. B 型流感病毒；e. 1 型副流感病毒；f. 2 型副流感病毒；g. 3 型副流感病毒；h. 呼吸道合胞病毒。放大倍数为 170 倍。由 Quidel 提供，见彩插

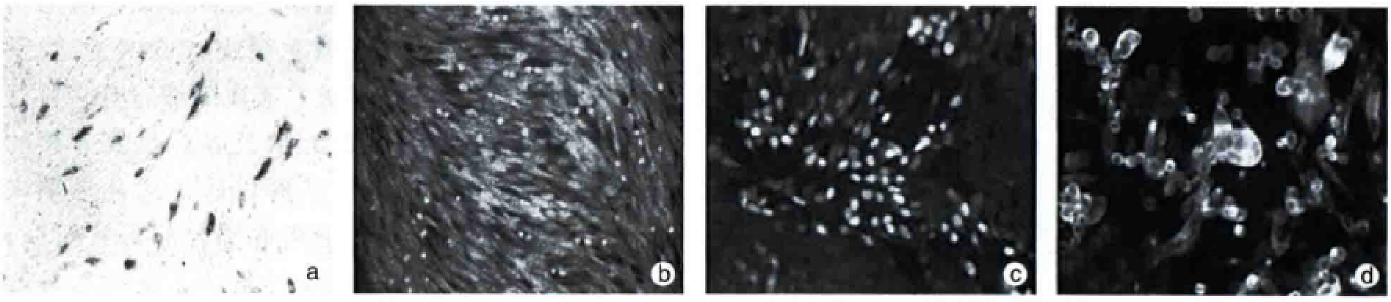


图 82-3 检测 ELVIS 细胞中 HSV-1 和 HSV-2(Quidel)

注：a. X-gal 染色显示蓝色细胞为 HSV 阳性；b. 未经接种的 ELVIS 细胞免疫荧光染色；c. HSV-1 阳性的 ELVIS 细胞免疫荧光染色(荧光为细胞核内)；d. HSV-2 阳性的 ELVIS 细胞免疫荧光染色(荧光位于细胞质内)。放大倍数位于 170 倍。由 Quidel 提供，见彩插

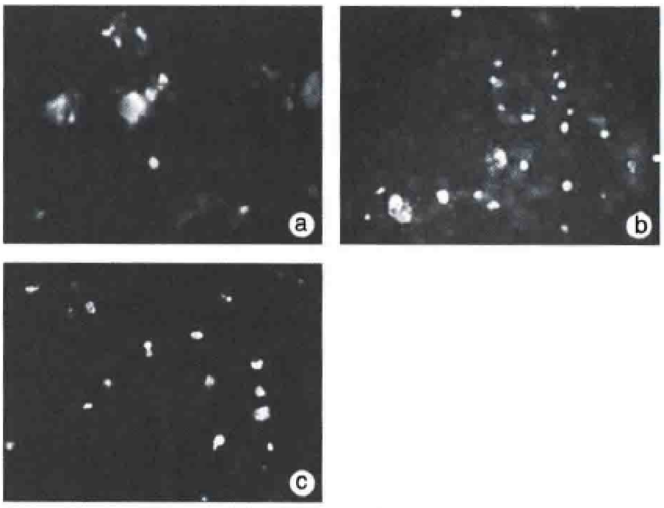


图 82-4 使用双重免疫荧光染色(Quidel)检测临床标本中呼吸道病原体。(a，b)流感病毒 A 二重染色：金色表示流感病毒 A 阳性，而呼吸道病毒组合(包括腺病毒，流感病毒 B，副流感病毒 1、2、3 和呼吸道合胞病毒)为绿色

注：a. 上述染色的阴性细胞；b. 流感病毒 A 阳性细胞；c. RSV 二重染色[RSV(金色)，呼吸道病毒组合包括腺病毒、流感病毒 A、B，副流感病毒 1、2、3(绿色)：RSV-阳性和 influenzaA-阳性细胞]。放大倍数为 170 倍。由 Quidel 提供，见彩插

为了保证实验人员的安全和避免细胞污染，在实验全过程中实验室内所有人员必须严格遵守生物安全规章制度[8,10]，包括：①使用二级或二级以上带有 HEPA 滤膜的生物安全柜，如果条件允许，使用外部通风装置的生物安全柜，至少每年质检一次。②根据实验所涉及病毒的生物危害等级来选择合适的设备和试验规程，病毒的生物危害等级依据疾病预防控制中心(Atlanta，GA)的定义[11]。③对实验室人员进行培训，每年进行能力评估。实验台和生物安全柜至少每天 1 次使用高浓度消毒剂(如 10% 次氯酸钠)进行消毒。

(一)传统的细胞培养法

常见的可培养的导致人类严重感染的病毒病原已有多种细胞可用于检测，表 82-2 包括了已经建立的细胞系。细胞系可以是原代细胞(如恒河猴肾细胞和兔肾细胞)可传 1～2 代；二倍体细胞(如人胚肺细胞)可传 20～50 代；或者是异倍体细胞(如人肺鳞癌细胞)可进行无限制传代。实验室必需要维持足够多种类的细胞株，将细胞孵育到最佳的时间长度和合适的状态，以保证实验室接受到的所有标本中潜在的可检测的病毒都能被检出[8,10,12]。细胞培养体系是充满变数的，对那些能对实验结果产生不利影响的因素很敏感，这些因素包括培养细胞的来源及细胞系、单层细胞培养时间、状态、代数、运送条件及是否存在污染物等。例如，2012 年，发现提供给全美国临床实验室的恒河猴肾细胞被粗球孢子菌污染，这种菌来自制备细胞用的猴肾的内源性感染[13-14]。由于及时的通知和快速的实验室生物安全防护，没有造成工作人员感染这种高致病性真菌[13]。因此，必须严格遵循质控程序和每项实验的操作规程[8,10,15]。运来的(买来的)细胞需要在显微镜下观察来确定细胞单层的融合度是否适当(达到 75%～90%)；细胞是否贴壁生长；细胞的形态是否典型(意为符合所需细胞的形态)；无病毒、细菌或真菌的污染，如果有污染存在，通常会产生细胞病变效应或者培养基变浑浊。加入新运(买)来的细胞培养液也应是无菌的(清亮)、pH 中性(鲑鱼样粉红色)。如果实验室需要自己制备加入商品化培养基中的其他成分，如 L-谷氨酰胺或抗生素等，必须检查以保证

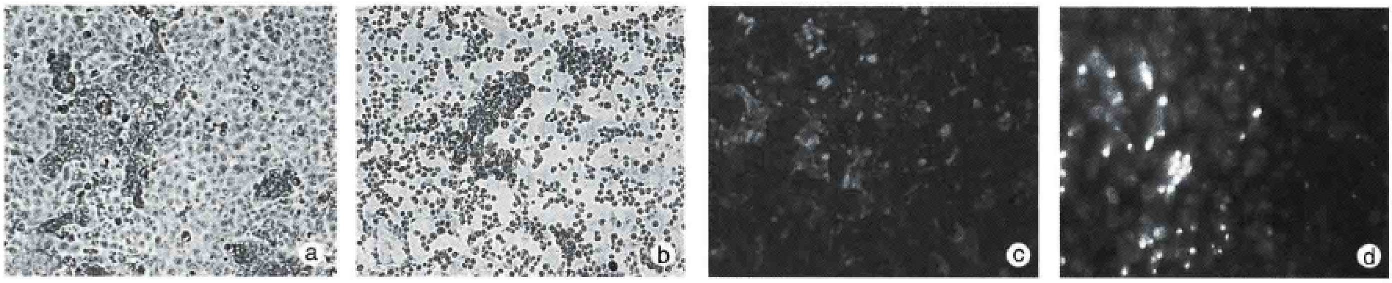


图 82-5　Super E-Mix 细胞中柯萨奇病毒 B 的检测(Quidel)

注：a. 未染色未接种病毒的细胞；b. 未经染色的柯萨奇病毒 B 细胞 CPE 现象；c 和 d 显示的是用通用肠道病毒组合抗体的免疫荧光的染色结果；c. 未接种病毒的 Super E-Mix 细胞，使用通用肠道病毒抗体的免疫荧光染色；d. 柯萨奇病毒 B 感染的细胞染色。放大倍数为 170 倍。由 Quidel 提供，见彩插

加入这些成分后的培养基为无菌、适宜的 pH、能确保细胞的生长及对细胞无毒性作用。还需要记录所有培养基、缓冲液、试剂和其他自制成分的批号和使用时间。

细胞培养管需要斜面放置，使所有单层细胞被培养基所覆盖。为使细胞依赖的生物体能在最佳状态下增殖呈现出细胞毒性，需要在收到组织培养细胞后 7 天内进行接种(距厂家传细胞管 8～10 天)，实验室需保留细胞生产厂商提供的所有资料，包括细胞种类、来源、传代数和细胞传代后的天数等记录。未使用的同一批次培养管、培养板或离心管可以同细胞一起进行孵育、观察，从而作为 CPE、毒力试验、外界污染，以及 DFA、HAD 和血球凝集等试验的阴性对照。阳性对照不需要每天做，但是如果实验室新收到一批细胞时，则需要用分离的病毒对新一批的细胞进行质控，同时也可作为 DFA、HAD 等实验的阳性对照。

除一些生长缓慢的病毒如巨细胞病毒(CMV)或者病毒滴度很低的情况，用传统的细胞管分离通常在接种后 1～7 天就可以检测了[4]。病毒增殖检测的标准方法是采用显微镜观察未经染色细胞的 CPE 现象。可通过细胞的退行性改变，包括细胞皱缩、肿胀、变圆、聚集、细胞融合体的形成，以及细胞单层的完全破坏来判断病毒的存在。通过 CPE 特点、所用细胞株、检测到病变的时间长短、标本类型对病毒进行鉴定。最后通过特异性单抗染色对病毒进行确认。对那些还没有特异性单抗可用来进行鉴定的病毒，需要通过分子生物学方法或其他传统试验(如鼻病毒耐酸试验)进行鉴定。此外，对于一些 CPE 现象不明显的特定病毒(如流感、副流感和腮腺炎病毒)，可进行 HAD 试验[16]。

(二)HAD 试验

红细胞吸附试验(hemadsorption，HAD)是指红细胞可吸附于感染了病毒的细胞单层。流感病毒 A 和 B、副流感病毒 1、2、3 和 4 及腮腺炎病毒可产生一种表达于感染细胞表面的表面血凝素蛋白[16]。这种血凝素蛋白结合红细胞并将其吸附于感染细胞的细胞膜。HAD 试验可用于当培养物中无明显可见的 CPE 或者作为在细胞培养中正黏病毒和副黏病毒有可疑 CPE 出现时的快速筛查。HAD 试验通常在接种后孵育 3～7 天时或者在孵育期结束时(通常是 10～14 天)进行。典型的 HAD 试验流程包括将豚鼠红细胞和病毒培养的细胞单层于 4℃ 下进行孵育，并于 30 min 后通过显微镜观察评估单层上是否有红细胞吸附或上清液出现红细胞凝集。HAD 阳性的培养可进一步通过 MAbs 确认感染病毒的身份(the identity)，而 HAD 阴性培养物可在去除红细胞并加入新鲜培养基成分后重新孵育。所用的阳性和阴性质控培养管非常关键，因为 HAD 试验过程中各个实验室的变异因素很多，同时当时流行的主要流感病毒株也可能变化[17]。用 MAb 直接染色检测细胞单层中感染的病毒株(如流感病毒和副流感病毒)已在大多数临床实验室替代了 HAD 这一常规程序，因为染色法更特异并且出结果更快，这在患者的治疗中非常重要。

(三)离心-增强快速细胞培养法

离心-增强接种方法(centrifugation-enhanced inoculation)是用传在置于离心瓶中的盖玻片上的

细胞进行离心接种培养，在CPE出现前就使用特异性单抗检测细胞单层中的病毒抗原，第一次描述这种方法是用于检测沙眼衣原体(*Chlamydia trachomatis*)[18]。这项技术已适用于CMV的常规检测，采用MRC-5离心瓶，用抗CMV早期蛋白的特异性单抗进行染色[19]。这项开创性的方法已经使病毒检测时间从10～30天缩短至16～72 h，缩短检测时间的重要原因在于通过接种时的离心对细胞单层施压[20]。该过程已证实可促进细胞增殖、缩短细胞传代时间、改变细胞代谢、增加细胞寿命，并激活了特异性基因。

快速细胞培养现在通常用于衣原体属(*Chlamydia* spp.)、CMV、肠道病毒(enteroviruses)、VZV、HSV、腮腺炎病毒(mumps viruses)和主要的呼吸道病毒[腺病毒(adenovirus)，人类偏肺病毒(human metapneumovirus，HMPV)，流感病毒(influenza)A和B型，副流感病毒(parainfluenza)1，2，3型和呼吸道合胞病毒(respiratory syncytial virus，RSV)]的检测[7]。离心增强快速细胞培养可以使用标准细胞株(表82-2，图82-1)并且已经适用于利用混合细胞培养(表82-3)检测呼吸道病毒(R-Mix and R-Mix Too；Quidel公司，Athens，OH)(图82-2)，检测HSV和VZV(H&V-Mix；Quidel)(图82-6)[21-23]；利用基因工程细胞例如ELVIS(酶联病毒诱导系统；Quidel)(表82-3)检测HSV(图82-3)[24-25]和利用Super E-Mix (Quidel)检测肠道病毒(图82-5)。使用离心-增强快速细胞培养鉴定病毒不依赖于可见的CPE，使得不熟悉CPE识别的技术人员也可以进行病毒学实验，取而代之的是，病毒可使用"盲染"或者在"CPE"出现前进行染色，可使用藻红蛋白、过氧化物酶或异硫氰酸荧光素标记的病毒特异性单克隆抗体、藻红蛋白和异硫氰酸荧光素共同标记抗体、使用β-半乳糖苷酶等作为底物的ELVIS HSV系统检测的病毒特异性诱导的酶[6,24-25]。使用诸如R-Mix、R-Mix Too、H&V-Mix和Super E-Mix的混合细胞的最大好处是可以使用单个离心管或培养板组合进行多种病毒检测，而不需使用多个离心管来覆盖实验室需要在某个单个特定标本中希望检测到的所有病毒。一个离心管可替代4个不同种细胞培养的试管，而且试管细胞培养需要花费更长的时间(10～14天)，但检测的病毒亚种却比离心管法要少。

表82-2 细胞系和敏感病毒谱

细胞系	来源	病毒[a]
A-549	人类肺癌	腺病毒、单纯疱疹病毒、流感病毒、偏肺病毒、麻疹病毒、腮腺炎病毒、副流感病毒、脊髓灰质炎病毒、呼吸道合胞病毒、轮状病毒、水痘-带状疱疹病毒
AGMK[b]	非洲绿猴肾	肠道病毒、流感病毒、副流感病毒
AP61	蚊	虫媒病毒
B95 或 B95a	EB病毒转化类淋巴母细胞	麻疹病毒、腮腺炎病毒
BGMK	Buffalo绿猴肾	衣原体属、柯萨奇病毒B、单纯疱疹病毒、脊髓灰质炎病毒
C6/36	蚊	虫媒病毒
Caco-2	人类结肠直肠腺癌	星状病毒、人类冠状病毒(NL63)
CV-1	非洲绿猴肾	脑炎病毒(某些)、单纯疱疹病毒、麻疹病毒、腮腺炎病毒、轮状病毒、SV40、水痘-带状疱症病毒
Graham 293	腺病毒5型转化人胚肾	肠腺病毒
H292		腺病毒、柯萨奇病毒B、埃可病毒、单纯疱疹病毒、腮腺炎病毒、副流感病毒、脊髓灰质炎病毒、呼吸道合胞病毒、风疹病毒
HeLa	人类子宫颈腺癌	腺病毒、巨细胞病毒、柯萨奇病毒B、埃可病毒、单纯疱疹病毒、脊髓灰质炎病毒、鼻病毒、水疱性口炎病毒(印度株)、水痘-带状疱疹病毒
HeLa 229	人类子宫颈腺癌	腺病毒、衣原体属、巨细胞病毒、埃可病毒、单纯疱疹病毒、脊髓灰质炎病毒、水疱性口炎病毒(印度株)、水痘-带状疱疹病毒
HEL	人胚肺	腺病毒、巨细胞病毒、埃可病毒、单纯疱疹病毒、脊髓灰质炎病毒、鼻病毒、水疱性口炎病毒(印度株)、水痘-带状疱疹病毒
HEK	人胚肾	腺病毒、BK病毒、肠病毒、单纯疱疹病毒、麻疹病毒、腮腺炎病毒、鼻病毒
HEK 293	腺病毒5型转化的人胚肾	肠道腺病毒

（续　表）

细胞系	来源	病毒[a]
HEp-2	人鳞状上皮癌	腺病毒、衣原体属、柯萨奇病毒 B、单纯疱疹病毒、麻疹病毒、副流感病毒、脊髓灰质炎病毒、呼吸道合胞病毒
HNK	人类新生儿肾	腺病毒、单纯疱疹病毒、水痘-带状疱疹病毒
Hs27(HFF[c]；MRHF)	人包皮成纤维细胞	腺病毒、巨细胞病毒、埃可病毒、单纯疱疹病毒、腮腺炎病毒、脊髓灰质炎病毒、鼻病毒、水痘-带状疱疹病毒
HuH-7	人肝细胞	人类冠状病毒(OC43，229E)
LLC-MK2	最初的，恒河猴肾	虫媒病毒(某些)、肠道病毒(包括柯萨奇病毒 A 和 B、埃可病毒、脊髓灰质炎病毒)、人类偏肺病毒(NL-63)(注：原文有错：HMPV 是人偏肺病毒的缩写，而括弧里的 NL-63 是一株新发现的冠状病毒的名称)、流感病毒、MERS-CoV(中东呼吸综合征冠状病毒)、腮腺炎病毒、副流感病毒、痘病毒组、鼻病毒
Mv1Lu	水貂肺	巨细胞病毒、单纯疱疹病毒、流感病毒
McCoy[c]	鼠成纤维细胞	衣原体属、单纯疱疹病毒
MDCK	Madin-Darby 狗肾传代细胞	腺病毒(某些型)、柯萨奇病毒、流感病毒、呼吸道肠道孤儿病毒(或简称“呼肠孤病毒”)
MNA	鼠神经母细胞瘤	狂犬病病毒
MRC-5	人胚肺	腺病毒、巨细胞病毒、柯萨奇病毒 A、埃可病毒、单纯疱疹病毒、流感病毒、腮腺炎病毒、脊髓灰质炎病毒、鼻病毒、呼吸道合胞病毒、水痘-带状疱疹病毒、艰难梭菌细胞毒素
NCI-H292	人肺黏液表皮样癌	腺病毒、BK 多瘤病毒、肠道病毒(大多数)、单纯疱疹病毒、麻疹病毒、呼吸道肠道孤儿病毒(呼肠孤病毒)，鼻病毒(大多数)、呼吸道合胞病毒、牛痘病毒
RD	人横纹肌肉瘤	腺病毒、柯萨奇病毒 A、埃可病毒、单纯疱疹病毒、脊髓灰质炎病毒
RK[b]	兔肾	单纯疱疹病毒、副黏病毒
RhMK[b]	猕猴肾	虫媒病毒、柯萨奇病毒 A、B、埃可病毒、流感病毒、副流感病毒、麻疹病毒、腮腺炎病毒、脊髓灰质炎病毒
SF	人包皮	腺病毒、巨细胞病毒、柯萨奇病毒 A、埃可病毒、单纯疱疹病毒、脊髓灰质炎病毒、水痘-带状疱疹病毒
Vero	非洲绿猴肾	腺病毒、虫媒病毒(某些)、衣原体属、柯萨奇病毒 B、人类偏肺病毒、单纯疱疹病毒、麻疹病毒、中东呼吸综合征冠状病毒、腮腺炎病毒、脊髓灰质炎病毒 3 型、轮状病毒、风疹病毒
Vero E6	非洲绿猴肾 E6	腺病毒、柯萨奇病毒 B、单纯疱疹病毒、麻疹病毒、腮腺炎病毒、脊髓灰质炎病毒 3 型、轮状病毒、风疹病毒、SARS-CoV(中东呼吸综合征冠状病毒)
Vero 76	非洲绿猴肾 76	腺病毒、柯萨奇病毒 B、单纯疱疹病毒、麻疹病毒、腮腺炎病毒、脊髓灰质炎病毒 3 型、轮状病毒、风疹病毒、西尼罗病毒
WI-38	人肺	腺病毒、巨细胞病毒、柯萨奇病毒 A、埃可病毒、单纯疱疹病毒、流感病毒、腮腺炎病毒、脊髓灰质炎病毒、鼻病毒、呼吸道合胞病毒、水痘-带状疱疹病毒

注：[a] MERS-CoV. 中东呼吸综合征冠状病毒；SARS-CoV. 严重急性呼吸系统综合征冠状病毒；[b] 原代细胞培养；[c] 可提供新鲜或冷冻到实验室即可使用状态的细胞(Quidel)

表 82-3　混合培养的细胞系和敏感病毒谱列表[a]

细胞混合产品[b]	细胞类型	病毒
R-Mix[c]	Mv1Lu (水貂肺)	巨细胞病毒、单纯疱疹病毒、流感病毒、SARS-CoV
	A549(人肺癌)	腺病毒、单纯疱疹病毒、流感病毒、偏肺病毒、麻疹病毒、腮腺炎病毒、副流感病毒、脊髓灰质炎病毒、轮状病毒、呼吸道合胞病毒、水痘-带状疱疹病毒
R-Mix Too[c]	MDCK (狗肾传代细胞)	流感病毒
	A549(人肺癌)	腺病毒、单纯疱疹病毒、流感病毒、偏肺病毒、麻疹病毒、腮腺炎病毒、副流感病毒、脊髓灰质炎病毒、轮状病毒、呼吸道合胞病毒、水痘-带状疱疹病毒
H&V-Mix	CV-1(非洲绿猴肾)	脑炎病毒(某些)、单纯疱疹病毒、脊髓灰质炎病毒 1 型、麻疹病毒、腮腺炎病毒、轮状病毒、SV40、水痘-带状疱疹病毒

（续 表）

细胞混合产品[b]	细胞类型	病毒
	MRC-5（人胚肺）	腺病毒、巨细胞病毒、埃可病毒、单纯疱疹病毒、流感病毒、腮腺炎病毒、脊髓灰质炎病毒、鼻病毒、呼吸道合胞病毒、水痘-带状疱疹病毒
Super E-Mix[c]	sBGMK（(Buffalo 绿猴肾)(有退化或降解激活因子)	衣原体属、柯萨奇病毒 A 和 B、埃可病毒、单纯疱疹病毒、脊髓灰质炎病毒
	A549(人肺癌)	腺病毒、单纯疱疹病毒、流感病毒、偏肺病毒、麻疹病毒、腮腺炎病毒、副流感病毒、脊髓灰质炎病毒、呼吸道合胞病毒、轮状病毒、水痘-带状疱疹病毒
ELVIS	用HSV UL97 启动子/E. coli lacZ 基因转染的幼仓鼠肾细胞	单纯疱疹病毒-1、单纯疱疹病毒-2

注：[a] SARS-CoV. 严重急性呼吸系统综合征冠状病毒；[b] Quidel 有售；[c] 可提供新鲜的或冷冻的到实验室即刻可使用状态的细胞(Quidel)

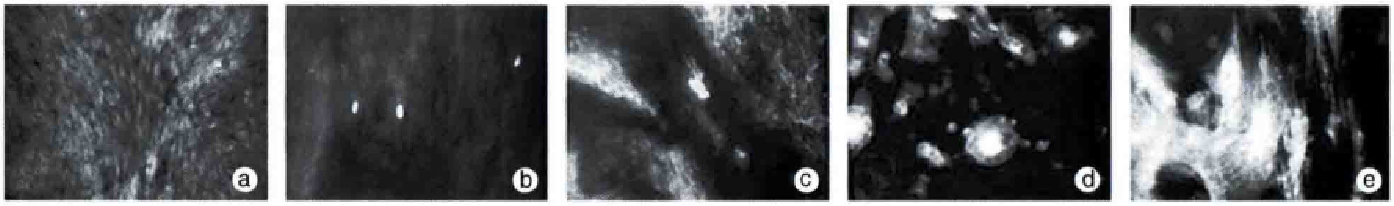


图 82-6 免疫荧光染色检测 H&V-Mix 细胞中疱疹病毒科的病毒(Quidel)
注：a. 未接种病毒的 H&V-Mix 细胞；b. 巨细胞病毒(CMV)；c. 水痘-带状疱疹病毒(VZV)；d. 1 型单纯疱疹病毒(HSV-1)；e. 2 型单纯疱疹病毒(HSV-2). 放大倍数为 170 倍。由 Quidel 提供，见彩插

由于快速检测方法不是基于 CPE 的检测，而是对单个或多个病毒的盲染，因此，在进行患者检测时，每天都需要制备阳性和阴性质控片。当实验室使用一种培养系统去检测多种不同病毒时，在收到试剂时，要根据说明书确认针对所有病毒种类的检测试剂都是有效的(包括混合的单抗)[10-12]，病毒分离的质控片应该每天做，质控片的病毒种类可以轮流做，这样在 1 周内可保证用于常规分离的病毒的所有细胞和试剂都做了质控。

(四)ELVIS

ELVIS 使用的是基因工程构建的细胞株(BHKIC-P6LacZ)，最早是由 Stabell 和 Olivo 对这种细胞进行了描述[6]。HSV UL97 基因的启动子序列和大肠杆菌 *lacZ* 基因用于稳定地转化幼仓鼠肾细胞株。当 HSV 感染了细胞时，病毒毒粒中的反式激活因子蛋白 VP16 和其他反式激活因子(如 ICP0)强力激活 UL97 启动子，进而激活 *lacZ* 基因，引起半乳糖苷酶的活性水平增高。此外氯吲哚-D-半乳糖苷(X-Gal)使无色底物变为蓝色，指示 HSV 感染细胞的存在(图 82-3a)。如果需要对 HSV 分型，荧光标记的特异性检测 HSV-2 的单抗(图 82-3d)和无荧光标记的特异性检测 HSV-1 的单抗混合后进行染色。如果感染的细胞(蓝色)未被 HSV-2 单抗检测出，细胞可再通过抗鼠荧光标记抗体染色来检测 HSV-1 单抗(图 82-3c)，ELVIS 的整个过程在 16～24 h 内完成，可得到阳性和阴性结果[24-25]。

(五)细胞毒性试验

常采用人包皮成纤维细胞、MRC-5 细胞和 Vero 上皮样细胞做组织培养实验检测艰难梭菌产毒株[26-28]。用细胞实验检测艰难梭菌毒素比艰难梭菌 A/B 毒素的免疫学实验敏感性好。肠道病毒可导致类似于艰难梭菌毒素产生的 CPE 现象，因此，该实验通过使用艰难梭菌毒素的抗毒素，使方法具有更高的特异性。该试验所使用的接种液可以是液态粪便或者经分离后纯化的一个艰难梭菌菌落的肉汤培养液，这两种情况下液体都经过稀释，采用滤过膜去除杂菌，分别加入含有和不含有艰难梭菌抗毒素的细胞孔中，使细胞暴露于患者的材料。如果无艰难梭菌抗毒素的测试孔在 12～48 h 出现了 CPE 现象，而含有艰难梭菌

抗毒素的对照孔不出现 CPE 现象，艰难梭菌毒素实验为阳性。低至 1 pg 的毒素即可导致细胞在数小时到 1～2 天内发生可见改变。

四、细胞培养基

(一)运输培养基和标本收集拭子

应用细胞培养的方法时需要认真考虑的一个问题是如何确保采集到的标本中含有细胞，并且从标本采集到接种到培养细胞这段时间内生物体是存活的状态。因此，对所有类型的标本，都需要对采集标本到标本接种的处理时间、运送温度及运输培养基的影响进行评估。培养基中添加抑制微生物生长的抗菌药物和抗真菌药物等成分，以保证标本在运送过程中病毒是存活的。运输培养基可能是病毒的特异运输培养基，或是允许衣原体、支原体和脲原体生长的通用运输培养基。运输培养基的类型、用途、成分，以及标本的采集过程和拭子的使用在 81 章有详细的描述。

1. 含 10% 胎牛血清的生长培养基　细胞培养基在细胞生长和维持细胞状态中起着重要的作用。用于细胞种子(储存)生长的培养基，比维持细胞状态的培养基营养更加丰富。培养基中较高浓度的血清或蛋白可以促进细胞快速的生长。通常细胞需要在生长培养基中培养 1 天或 1 天以上，再换液为维持培养基。标准生长培养基的成分为：含有 EBSS 的 EMEM、10% 加热灭活的胎牛血清(FBS)、一种或多种抗生素(庆大霉素、青霉素、链霉素、万古霉素或两性霉素 B)、HEPES 缓冲液。由于猴病毒是在原代猴肾细胞中内的，添加了猴病毒 5(SV5)和 SV40 抗血清的培养基有商品化供应(Quidel)。

2. 维持培养基　维持培养基中含有的营养成分和缓冲体系可避免细胞的快速生长但又保护细胞单层呈健康状态，在细胞长成单层后等待接种标本和接种后等待发现病原体过程中使用。已传细胞的培养瓶、试管、培养板和离心小管在生产厂家把细胞送出去前可能被多次更换维持培养基，以保证细胞的生长状态适合不同的特殊规格，并在细胞送达用户时能够及时使用。送达用户实验室后，大多数细胞在数天之内能够保持稳定状态，不需更换培养基。在使用细胞前，需要将运输培养基更换为含有 2% FBS 的 EMEM 或 10% 的 FBSHanks 缓冲液最小必须培养基。对于可被血清蛋白抑制的病毒(如正黏病毒和副黏病毒)，需换液为 R-Mix 培养基。根据需要还可加入胰酶和抗菌药物。其他病毒培养基还包括 E-Mix 培养基(Quidel)和含有 5% 或 10% FBS 的生长培养基。试管细胞培养需要每周 1 次或每周 2 次更换培养基。然而，如果使用离心小管或培养板，只需要在接种前换一次液。现已有添加或未添加其他成分(如 PBS、左旋谷氨酰胺、胰酶、抗细菌和真菌的药物等)的商品化培养基。

3. 衣原体分离培养基　一些细胞依赖性细菌(如沙眼衣原体)需要宿主细胞限制其自身蛋白的合成，使得感染的病原体更容易复制。因此，用作衣原体属增殖的细胞培养基中通常需要加入放线菌酮(一种蛋白合成抑制剂)。离心小管中用于衣原体分离的细胞培养基通常为含有 EBSS 的 EMEM 培养基，加上 10% FBS、HEPES、葡萄糖、非必需氨基酸、抗生素(放线菌酮、庆大霉素或者链霉素)和两性霉素 B。

4. EMEM pH 2～3　鼻病毒的培养温度比许多其他人类致病的病毒低，它的 CPE 的特点与肠道病毒很相似，现阶段还没有可用于鼻病毒鉴定的单抗。酸溶液具有中和鼻病毒的能力，降低鼻病毒滴度，而肠道病毒对酸不敏感，可用于区分鼻病毒和肠道病毒，即酸敏感性试验。pH 为 2～3 的 EMEM 可用于酸敏感性试验。

5. RPMI 1640 培养基　RPMI 1640 培养基含有葡萄糖、必需氨基酸、其他氨基酸、多种维生素、HEPES 缓冲液、抗生素(如青霉素和链霉素)和指示剂酚红。这种营养丰富的培养基可用于淋巴细胞培养和 HIV 培养。

(二)专用培养基

1. CMV TurboTreat 培养基　CMV Turbo Treat 预处理培养基(Quidel)由下列成分组成：含 EBSS 的 EMEM(无酚红)、10% FBS、HEPES 和庆大霉素。在标本加入前，预处理 Mv1Lu、R-Mix 和 MRC-5 细胞过夜有助于 CMV 的分离[29]。

2. ELVIS 替换培养基　ELVIS 替换培养基(Quidel)用于 ELVIS 检测系统，成分有：EMEM、FBS、链霉素和两性霉素 B。

3. R-Mix 更换和冲洗用培养基 R-Mix 细胞更换和冲洗用培养基用于新鲜或冻存(冰冻离心小管)R-Mix 或 R-Mix Too 细胞培养系统(Quidel),是含有胰酶、青霉素和链霉素的无血清培养基。

五、诊断病毒学实验室的质量控制

诊断试验结果的有效性和合法性取决于试验的每一个环节所采取的措施,包括检验前、检验中和检验后,这些措施是整体质量保证方案中的一个部分。而病毒诊断实验室的质量控制就是整个质量保证程序中的一个要素,包含了确保每一个测试项目能正确开展的相应措施,以保证实验室能够持续地提供准确的结果。质控过程的关键在于对于内部和外部质控品的使用及对于质控品的验证以确保在制造商要求的可接受范围内,遵从实验过程中的孵育时间和孵育温度,保证试剂盒在效期内使用。通过内部质控能够证明实验的每一步都正确操作,而外部质控能够监测实验的一致性及试剂的批间差异。最佳的实践方式是对诊断病毒学实验室开展的每一个项目引入质量控制程序[30-31]。实验室必须遵照 CAP(College of American Pathologists),CLIA 或其他认证机构的规定要求,最低限度也应该按照试剂制造商所推荐的频次进行质量控制。有一些商业机构可提供可靠的 QC 材料以供采购,包括特定的病毒株、提纯了的核酸、抗原、抗体及其他生物试剂。很多公司同时也提供实验室可参加外部质量评价和能力验证项目。以下附录中列出了部分可提供 QC 材料的制造商。

附录

病毒学试剂、染色、培养基、细胞系和质控品(包括分子诊断)的供应商

American Type Culture Collection
Manassas, VA 20110
http://www.atcc.org

BBI Solutions
Cardiff, Wales, UK
http://www.bbisolutions.com

BD Biosciences
Franklin Lakes, NJ 07417
http://www.bdbiosciences.com

Bio-Rad Laboratories
Hercules, CA 94547
http://www.bio-rad.com

Cambrex Corporation (BioWhittaker Cell-Products)
East Rutherford, NJ 07073
http://www.cambrex.com

Lonza, Inc.
Allendale, NJ 07401
http:/www.lonza.com

Maine Molecular Quality Controls, Inc.
Saco, ME 04072
http://mmqci.com

Meridian Bioscience
Cincinnati, OH 45244
http://www.meridianbioscience.com

MilliporeSigma (Chemicon)
Billerica, MA 01821
http://www.millipore.com

Qnostics Ltd
Glasgow, G20 OXA, Scotland UK and Shirley, NY 11967
www.qnostics.com

Quality Control for Molecular Diagnostics
Glasgow, Scotland, UK
http://qcmd.org

Quidel(Diagnostic Hybrids)
Athens, OH 45701
http://www.quidel.com

SeraCare Life Sciences
Milford, MA 01757
www. seracare. com

ThermoFisher Scientific (Remel)
Waltham, MA 02451
http://thermofisher. com

Trinity Biotech (Bartels, MicroTrak)
Carlsbad, CA 92008 and
Bray, County Wicklow, Ireland
http://www. trinitybiotech. com

Vircell
Avicena 8, 18016 Granada, Spain
www. en. vircell. com

Zeptometrix Corporation
Buffalo, NY 14202
www. zeptometrix. com

参考文献请扫二维码查阅

第83章　病毒的检测和鉴定程序

MARIE LOUISE LANDRY,ANGELA M. CALIENDO,CHRISTINE C. GINOCCHIO,RANDALL HAYDEN,YI-WEI TANG

（喻华　译;钱渊　审校）

病毒学依然是一个迅速发展的领域。自从1970年第一版临床微生物手册出版以来,病毒学已经在临床实验室的主流中占有牢固的地位。当传统的病毒学方法(即常规的细胞培养、抗血清中和试验来鉴定病毒、手工操作的血清学技术、光学和电子显微镜技术)为主流时,诊断性病毒学是一个特定的与众不同的学科,主要是用于公共卫生、科研和学术机构的实验室。出结果时间很长,经常听说在得到结果时患者已经死亡或好转。

一、诊断技术的进展

受到有效的抗病毒治疗的驱动,诊断技术的进步已经改变了相关领域,可以在临床(诊治)有效的时间框内得到正确的检验结果。早期的实验室技术改进包括酶免疫法、IgM 捕获法、单克隆抗体鉴定法,离心小管培养法和免疫荧光法直接检测临床标本中的病毒抗原。在床边的快诊(point of care,POC)方面,侧流免疫层析法检测病毒的抗原或抗体只需 10～20 min,且不需要特殊的仪器设备和外加的试剂,可即刻对临床的诊治产生影响。然而,最大的革新是核酸扩增试验(nucleic acid amplification tests,NAATs),既快速又灵敏;可自动化、高通量;随时可做;可以检测到常规细胞培养检测不到的病毒。

一开始,NAAT 技术仅在有限的专业性很强的分子实验室开展,这些实验室使用多步骤、技术要求高、实验室自建的方法,需要针对每一种病原体优化独立的检测方法。几十年来,仅有少数的商品化 NAAT 通过了 FDA 的放行或正式批准。得益于技术的进步、实时扩增的方法、方便用户使用和 FDA 对新产品的批准和放行,随着本手册每个新版本的发行,实验室向分子生物学方法的转型加快了。

长期以来,培养一直被认为是诊断的金标准,因为能够检测到各种病原体或发现一些意想不到的病毒。而通过 NAAT 症候群相关病毒的检测模式,首先是对呼吸道病毒,然后是脑膜炎/脑炎和胃肠道致病病原体的检测,使得病毒培养对于临床诊治的意义越来越小。不仅仅是因为这些新方法更加快速,出结果只需要不到 1 h 或几个小时,且比培养方法能够检测更多的病毒,还包括可能引起类似症状的非病毒病原体,并且对于人员的技术能力要求也比培养低。有些方法仅需要操作人员将未处理过的样本加到一个装置,然后放置到仪器中,仅需 2 min 左右的操作时间。当需要在更小范围内作出诊断时,也可以选择仅包含 2～3 种主要病原体的多重但小范围的检测盘。

为了定量监测血液中的病毒载量,更多的试剂盒得到了 FDA 的批准在制定和完善国际定量标准方面已经做了大量的工作(如巨细胞病毒、EB 病毒、多瘤病毒 BK 和细小病毒 B19),该定量标准将作为不同单位实验室间的比较和结果解释的指南。因此,不同实验室间的标准化和互相认可逐步得到完善。定量的 NAAT 同样需要批量试验,常常进行有限的小批量检测,有时对于 RNA 和 DNA 病毒采用不同的核酸提取步骤,或是不同的提取和扩增仪。最近的创新包括通过更灵活和自动化的方式容纳多个检测,不再需要进行独立的 RNA 或 DNA 提取,并且缩短检测时间。

自本手册第 11 版以来,快速流感病毒的免疫学检测已被 FDA 重新分类为Ⅱ类(中度潜在损

害)，必须满足最低性能检出的新要求，包括要报告对年度流行病毒株的反应性测试。如果快速免疫测定想要继续保持竞争力，就需要通过创新的办法提升其敏感性。如果能够实现的话，这些改变将使其他的 POC 免疫检测法极大地受益，因为这些免疫检测法操作简单且成本低，在条件有限的医院或诊所中尤其实用。

表 83-1 病毒检测和鉴定方法[a]

病毒	适用方法[b]					注释[c]
	核酸检测	抗原检测	病毒分离	抗体检测	病理	
腺病毒	A	A	B	B	B	核酸扩增方法(NAAT)是敏感性最高的检测方法，但对于各种类型的检测能力有所不同。定量 NAAT 用于监测免疫受损宿主体内的病毒载量。快速抗原检测方法用于眼部、肠道、或呼吸道的腺病毒感染，但敏感性不如培养或 NAAT
虫媒病毒	A、C	B	C	A、C	D	NAAT 和 IgM 可用于急性感染，具体取决于患病天数和临床疾病。但是，除了 NWV 以外，NAAT 不能用于大多数嗜神经性虫媒病毒。血清学交叉反应是有问题的，尤其是对于寨卡病毒和登革热病毒；CDC 提供了更特异的 PRNT，登革热病毒可进行快速抗原检测。大多数虫媒病毒可以分离培养，很多类型的病毒分离需要 BSL3 或 4(P3 或 P4 实验室)
博卡病毒	A	D	D	D	D	NAAT 是唯一可用的诊断方法，涵盖于一些呼吸道多重检测组合中。临床相关性需要进一步研究
冠状病毒 OC43，229E，NL63，HKU1	A	D	D	D	D	用NAAT 检测(作为多重病原检测的一部分)，用于呼吸道冠状病毒的检测
冠状病毒 SARS，MERS	A、C	C	C	C	D	针对 SARS-CoV 和 MERS-CoV 的 NAAT 和抗体检测仅可用于公共卫生和科研机构的实验室
巨细胞病毒	A	B	B	A	B	NAAT 是最敏感的方法，可以确定病毒载量。pp65 抗原血症可用于确定血液中的病毒载量，但 NAAT 的使用更为广泛。培养可以用于非血液样本。IgG 抗体用于确定免疫状态，而 IgM 抗体用于筛查近期感染。CMV 特异性 γ 干扰素释放测定已可用于评价细胞介导的免疫力
肠道病毒和副肠孤病毒	A	D	B	D	D	对于中枢神经系统的感染，肠道病毒的 NAAT 检测更敏感，会优先使用。副肠孤病毒需要单独的 NAAT 检测
EB 病毒(EBV)	A	B	D	A	B	血清学实验是诊断原发感染的首选。定量 NAAT 用于监测血液中的病毒载量。IHC 或 ISH 用于组织活检标本
丝状病毒和沙粒病毒	C	C	C	A、C	C	NAAT 是快速诊断的关键方法。除了 LCMV 外，病毒培养需要 BSL4(P4 实验室)严重的线状病毒感染患者可能直至死亡都没有抗体产生。LCMV 诊断主要用血清学方法
汉坦病毒	C	C	C	A	D	血清学和 NAAT 检测对于病毒诊断同样有用。IHC 用于致命性病例。病毒培养需要 BSL4。病毒分离困难
甲型肝炎病毒	D	D	D	A	D	血清学是标准的诊断性实验。在低流行区域 IgM 假阳性会是个问题
乙型肝炎病毒	A	A	D	A	D	特异性病毒抗原和抗体检测用于诊断和监测感染的病程。NAAT 用于监测治疗和确定基因型
丙型肝炎病毒	A	B	D	A	D	血清学用于诊断。NAAT 用于确定活动性感染和监测疗效。基因分型检测帮助确定用药方法和疗程长短。抗原测试在资源有限的场合是一种低成本的床旁检测替代方法
丁型肝炎病毒	A	A	D	A	D	检测仅限于参考实验室。仅在存在乙肝病毒感染时诊断是有临床意义的。活检组织 IHC 检测对诊断有用

（续 表）

病毒	适用方法[b]					注释[c]
	核酸检测	抗原检测	病毒分离	抗体检测	病理	
戊型肝炎病毒	A、C	D	D	A	D	血清学检测是标准的诊断方法，但各种检测方法之间的敏感性、特异性的差异显著。在低流行区域 IgM 假阳性是个问题。在移植患者的精确诊断时需要 NAAT 检测，CDC 会对于本土感染病例开展基因型检测
单纯疱疹病毒（HSV）	A	B	B	B	B	NAAT 是诊断的首选方法，尤其对于中枢神经系统感染。IFA 用于皮肤和黏膜病变的快速检测。血清学用于检测免疫状态
疱疹病毒 6A 和 6B	A	D	D	B	D	NAAT 为诊断的首选试验。血清学可用于记录儿童的初次感染。由于病毒整合到染色体，HHV-6NAAT 检测结果的解释比较复杂
疱疹病毒 7	B	D	D	B	D	NAAT 是检测的首选方法，但并不能实现常规开展
疱疹病毒 8	A	B	D	A	A	血清学用于识别已被感染过的人。血液 NAAT 检测对于移植后诊断和监测疗效可能有用。组织样本推荐使用 IHC
人类免疫缺陷病毒	A	A	C	A	D	血清学是基本的诊断方法。抗原/抗体联合检测减少了急性感染时窗口期时的血清阴性。定量 RNA 检测用于指导治疗和监测疗效。前病毒 DNA 检测（Proviral DNA tests）对新生儿感染的诊断有用
人类偏肺病毒	A	A	B	D	D	NAAT 为诊断首选方法。IFA 和离心管培养方法敏感性差一些。传统培养方法难以分离到病毒
人类 T 淋巴细胞病毒	B	D	D	A	B	血清学是基本的诊断方法。NAAT 仅用于定性的检测，当血清学不能确定时能够辅助诊断
流感病毒	A	A	B	D	D	NAAT 最敏感并且可以鉴定亚型。快速抗原检测敏感性和特异性低一些。IFA 和快速培养更准确。血清学适用于流行病学研究或回顾性诊断
麻疹病毒	A、C	C	C	A	D	血清学试验用于诊断和免疫力测定，NAAT 最适用于急性感染。病毒分离在发病早期有用（前驱期到出疹后 4 天）
腮腺炎病毒	A、C	C	B	A	D	血清学实验最广泛用于诊断和免疫力的测定。NAAT 对诊断有用，尤其适用于接种过疫苗的个体
诺如病毒	A	C	D	D	D	NAAT 为首选方法，但病毒株的变异是个大问题
副流感病毒	A	A	B	D	D	NAAT 比病毒分离敏感。IFA 是最常用的快速检测方法
乳头瘤病毒	A	D	D	D	A	NAAT 为检测和基因型分型的首选方法。细胞病理学可用于诊断
细小病毒 B19	A	C	D	A	B	血清学用于免疫力正常患者中 B19 的诊断。NAAT 是对于免疫抑制宿主、产生抗体前的早期感染和 B19 暴露胎儿的首选检测方法
多瘤病毒	A	B	D	B	A	NAAT 为可选方法，但是基因的变异性会导致假的低检出率或假阴性结果。脑脊液中 JC 病毒 DNA 检测对于初步诊断为 PML 的患者有用。JC 病毒抗体可以预测 PML 的危险性；血浆或尿中 BK 病毒 DNA 定量检测可用于 PVAN 的抢先诊断。IHC 和 EM 用于活检组织
痘病毒	A、C	C	C	A、C	A	NAAT 可用于病毒灭活检测和快速检测。电子显微镜（EM）非常适用于快速诊断但有应用局限性。天花病毒的分离需要在 BSL3 或 BSL4 实验室，并且只能在 WHO 合作中心进行。痘苗病毒需要在 BSL2 实验室操作，已经可以在细胞中培养
狂犬病病毒	C	C	C	A	A、C	对于人类狂犬病的检测需要在 CDC 进行。NAAT 和培养可用于唾液、脑脊液和组织标本的检测。IFA 用于皮肤活检。血清学试验用于 CSF 和血清检测。商业实验室可提供血清学试验，用于监测专业人员接种疫苗后的抗体滴度

（续 表）

病毒	适用方法[b]					注释[c]
	核酸检测	抗原检测	病毒分离	抗体检测	病理	
呼吸道合胞病毒	A	A	B	D	D	NAAT 最敏感。快速抗原检测尤其是 IFA 可以在儿科患者中使用。血清学试验仅在流行病学研究中有用
鼻病毒	A	D	B	D	D	NAAT 比培养敏感得多。存在与肠病毒的交叉反应
轮状病毒	A	A	D	D	D	抗原检测已经是诊断的标准试验。新的 NAAT 胃肠病毒系列包含了轮状病毒。如有电镜，则很有用
风疹病毒	C	D	C	A	D	血清学试验用于诊断和免疫力测定。NAAT 用于急性感染。早期病毒分离对出生后的风疹诊断是有用的（前驱期到出疹后 4 天）。如果是 CRS，可在出生后数周至数月内分离到病毒
传染性海绵状脑病病原体	B	B	D	D	A	组织学是最有用的诊断方法。替代标志物很受欢迎但是特异性不高。PrP 可在特定实验室使用免疫印迹法检测。实时震动诱导蛋白转换（RT-QuIC）的方法用于检测 PrP^{Sc}。人类基因组测序可用于基因异常的诊断
水痘-带状疱疹病毒	A	A	B	B	B	NAAT 最敏感而且得到越来越广泛的使用。IFA 用于皮肤病变比培养分离敏感。培养非常缓慢且不够敏感。血清学对于免疫力测定最有用，且对于中枢神经系统血管的病变有用

注：[a] 病毒核酸（DNA 或 RNA）可以通过扩增方法如 PCR 来检测。病毒抗原可通过一系列免疫方法检测。病毒分离包括传统细胞培养和通过免疫染色来测定病毒抗原的快速离心管培养。抗体检测包括针对全体或某一型特异抗原的免疫球蛋白测定。病理学检测包括见到病毒在组织或涂片细胞上产生的病变，包括包涵体、多核细胞、免疫组化，或原位杂交，或通过电镜技术看到病毒颗粒。[b] A. 试验通常用于常规的临床；B. 实验在特定情况下有用，根据感染的形式、标本的类型，在表格最右一列和在手册中单独章节中列出；C. 由于实验的特殊性或生物安全考虑，实验仅限于公共卫生实验室，如 CDC；D. 没有试验可用，一般不实用，或仅用于研究。[c] WNV. 西尼罗病毒；PRNT. 空斑减少中和试验；CDC. 疾病控制预防中心；BSL. 生物安全等级；CoV. 冠状病毒；SARS. 严重急性呼吸系统综合征；MERS. 中东呼吸综合征；CNS. 中枢神经系统；LCMV. 淋巴细胞性脉络丛脑膜炎病毒；IHC. 免疫组化；ISH. 原位杂交；PML. 进行性多灶性脑白质病；PVAN. 多瘤病毒相关性肾病；IFA. 免疫荧光法；EM. 电镜技术；CRS. 先天性风疹综合征；PrP. 朊病毒蛋白；CMV. 巨细胞病毒；HHV. 人疱疹病毒

另一个范式转变发生在 2015 年，当时首个 NAAT 被批准用于 POC，在 15 min 内即可获得流感病毒的结果，而某些呼吸道合胞病毒（respiratory syncytial virus，RSV）阳性则可在 2～5 min 内获得结果。随后其他 CLIA 豁免的 NAAT 也被引入，仅需将样本简单地添加到相关的装置中，然后插入仪器，通过实时 PCR，20～30 min 内就能获 A、B 型流感病毒（也可同时检测有无 RSV），而使用巢式 PCR 可在 60 min 内获得 14 种呼吸道病毒和 3 种细菌病原体的结果。这些 POC 检测与在良好实验室规范下获得的测试结果一样灵敏，充分证明了该领域的发展水平。因此，任何医院的实验室、急诊科、诊所或医生办公室都可以开展最新的分子检测。主要的障碍不再是缺乏技术专长和实验室设施，而是设备、服务和试剂的成本。此外，由于在实验室以外的地方开展检测可能会失去临床病毒学专家在结果解释方面的专业知识，对于多数病原体可能并不需要这些专业知识的解读，但对于某些结果（如脑脊液中潜伏性疱疹病毒检测），可能需要同时来自临床和实验室专业的解释。展望未来，如果准确快速的诊断带来的全部好处得以实现，应鼓励将好的操作指南和特异的实验结果结合起来。

二、挑战和前景

除了分子生物学试验的优点以外，随着其广泛应用，一些隐患也逐渐显现出来。例如，检测同一病毒的敏感性和特异性在不同方法间差异很大。此外，尽管检测的目标是基因组的保守序列，由于病毒株的变异和突变，可导致定量检测的结果偏低甚至出现定性和定量的假阴性。更有甚者，随着试验的敏感性越来越高，一些少量的与临床感染无关或非存活的病毒也可能被检出，从而误导临床医生。同样，当同一样本中检出多种病毒而无法获得相对定量时，如何解释这些病毒病原体与临床的相关性，也是问题。

因此，随着技术的进步又迎来了新的挑战，实验室需要选择去提供哪种平台和试验，应根据所

要检测的病毒、标本部位、临床表现、送检目的(例如,是筛查、确认、诊断还是监测)、患者特征和疾病的流行情况选择真正所需的试验方法。试验的操作特点、实验人员专业能力和试验成本同样会影响试验方法的选择。为了指导临床医生进行试验的选择和试验结果的解释,实验室必须认识到每种试验的用途和局限性。本书可用作完成这些任务的一项关键参考资料来源。对于每一种病毒的可选用的方法都不同且还在不断改进。表 83-1 提供了针对每一群病毒简明的概述,然而,读者还是要参考相应的章节以便阅读更详细的论述。

二代测序对病原体耐药性的检测、院内暴发的管理、致病病原体特征的描述和监测,以及宏基因组技术对不明疾病病因学的揭示,将是下一波技术进展的开端,使这些技术从研究领域向临床应用转化。与其他分子检测一样,这些技术将为病毒学提供更接近其他临床微生物学实践的动力。然而,在应用二代测序进行常规诊断的实施中仍存在诸多挑战,包括所需要的技术专业性、仪器成本、出结果时间、生物信息学和结果的解释。尽管变革的步伐对于试验而言是艰巨的,但能够见证最先进的检测给患者带来诊疗上的改善确是令人兴奋的。在前进的过程中,实验室人员之间保持相互沟通以解决问题至关重要,包括方法的优化和标准化,此外,还需要鼓励临床医生的参与和反馈。由于方法学的快速改进及新病毒和疗法的不断发现,强烈建议阅读最新的文献,了解最新进展。

第11篇

RNA病毒

第 84 章 人类免疫缺陷病毒*

S. MICHELE OWEN

(韩晓旭 译;徐春晖、曹彬 审校)

一、分类

(一)历史回顾与起源

人类免疫缺陷病毒(human immunodeficiency virus,HIV)是获得性免疫缺陷综合征(acquired immunodeficiency syndrome,AIDS)的病原体。1981 年,人们首次认识了 AIDS 的临床表现[1]。1983 年分离到了导致这种严重细胞免疫功能失调的淋巴结病相关病毒[2]。1 年后,另外一些研究者从 AIDS 患者体内分离出了能引起细胞病变的逆转录病毒,他们把这种病毒命名为Ⅲ型人类嗜 T 淋巴细胞病毒[3-4]。这两种病毒很快被证明是同一种病毒。1986 年国际病毒分类委员会正式将引起 AIDS 的病毒命名为人类免疫缺陷病毒[5]。

HIV 分为 HIV-1 型和 HIV-2 型,均属于逆转录病毒科(Retroviridae)慢病毒属(Lentivirus)。首先确定的 HIV-1 型(HIV-1)毒性更强,是造成全球绝大多数 AIDS 病例的病原体。1986 年首次分离出的 HIV-2 具有与 HIV-1 相似的生物学和形态学特性,但某些抗原成分与 HIV-1 不同[6]。与 HIV-1 相比,HIV-2 的致病性较弱,且分布地域较局限。HIV-1 和 HIV-2 都与猴免疫缺陷病毒(simian immunodeficiency viruses,SIV)相关。SIV 可在非洲 26 种灵长类动物中检出,但其在自然宿主体内并无致病性[7]。系统进化的证据表明,HIV-1 源自至少 3 次独立的 SIV 从黑猩猩向人类的动物源性传播(zoonotic transmissions),而 HIV-2 源于乌白眉猴 SIV 的 4 次跨物种传播[7-8]。回顾性研究从 1959 年的人类血浆标本中发现了 HIV 的遗传序列[9]。

(二)HIV 分类

HIV 是根据核苷酸序列的系统发育相关性来分类的。当前的分类是分级的,包括型、组、亚型、亚亚型和重组型[10]。亚型通常被称为分化支(clades)。上述分类中关系最远的是 HIV-1 型和 HIV-2 型。HIV-1 型进一步分为组:最常见的 M(major)组、亲缘关系更远的 O(outlier)组、非 M 非 O(N)组,以及新鉴定的与大猩猩 SIV 亲缘关系密切的 P 组[10-12]。多数 HIV 感染是由 HIV-1 型 M 组病毒引起的。HIV-1 型 M 组进一步分为 9 个亚型(A、B、C、D、F、G、H、J 和 K),A 亚型和 F 亚型毒株又分为亚亚型,即 A1、A2、A3 及 F1、F2。与来自不同亚型的毒株相比,相同亚型 HIV 毒株间基因组序列的相似性更高,并代表了不同的 HIV 谱系(lineages)。目前人们共鉴定出了 8 个 HIV-2 亚型(A～H),但其中只有 A 和 B 亚型毒株在一个以上的个体中检出。当 2 个或多个谱系的 HIV-1 毒株感染相同个体并交换基因成分,产生的新病毒命名为重组病毒[13]。当重组病毒株传播到 3 个或以上的个体,并测得病毒全基因组时,该病毒称为流行重组型(circulating recombinant form,CRF),且每个 CRF 都被赋予一个数字编号[13]。截至 2013 年 12 月,已有 55 个 CRF(CRF01～CRF55)被鉴定出来[14]。重组病毒株如果已经获得鉴定,但并无进一步传播的证据,则称为独特重组型(unique recombinant forms,URF)。HIV核苷酸序列的变化与病毒的生物学

*本章包含 Bernard M. Branson 和 S. Michele Owen 在本手册第 11 版第 82 章中呈现的部分内容

功能、病毒传播及患者的生存有关，对于明确HIV感染的地理分布和流行病学特征也有帮助。从诊断学的角度上看，病毒序列变异可能会改变病毒特异性蛋白和多肽，对以此为靶点的诊断试验的反应性和交叉反应性有重要影响。

二、病原体描述

(一)结构和基因组的构成

HIV是有膜蛋白包绕的正链RNA病毒。HIV基因组与其他逆转录病毒相似，包括*gag*、*pol*和*env*基因，分别编码结构蛋白、病毒的酶及包膜糖蛋白。基因组的两端是长末端重复序列。此外，病毒基因组还包括编码多种蛋白质的可读框，如反式转录激活因子Tat、病毒表达调控因子Rev和其他的一些蛋白质，如Vif、Vpr和Nef。

成熟的HIV病毒颗粒直径100～150 nm，有一个圆锥形核心，外面被脂类包膜包绕(图84-1)。病毒核心有2条长约10 kb单股RNA，它们被构成核衣壳和基质外壳的结构蛋白及*pol*基因的副产品所包围。病毒的脂质包膜是病毒出芽时从感染细胞获得的，HIV-1糖蛋白gp120/41构成的刺突突起于脂质包膜表面。糖蛋白是*env*基因编码的产物，首先合成前体gp160，再切割成构成胞外主要部分的高度糖基化的gp120蛋白，以及包含跨膜区的gp41蛋白。HIV-1的主要结构蛋白由*gag*基因编码，包括p17、p24、p7和p9。*pol*基因的编码产物包含蛋白酶、逆转录酶(reverse transcriptase，RT)、RNA酶和整合酶。

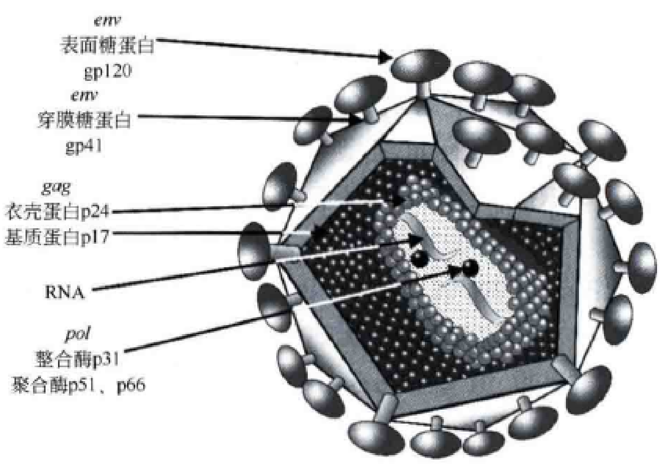


图84-1 病毒颗粒示意图

HIV-2结构与HIV-1类似，但一些蛋白成分不同，最明显的区别是表面蛋白gp125和跨膜糖蛋白gp36，以及核蛋白p16和p26。与HIV-1和HIV-2诊断有关的重要基因产物见表84-1。

表84-1 HIV有诊断意义的主要蛋白

HIV基因和产物		病毒蛋白/糖蛋白的分子量	
		HIV-1	HIV-2
env			
	前体	gp160	gp125
	外部糖蛋白	gp120	gp105
	跨膜糖蛋白	gp41	gp36
pol			
	逆转录酶	p66	p68
	逆转录酶	p51	p53
	核酸内切酶	p31	p31/34
gag			
	前体	p55	p56
	核心	p24	p27
	基质	p17	p16

(二)复制周期

HIV-1在体内的复制周期约为24 h[15]。以病毒gp120与靶细胞的细胞受体CD4相互作用介导的吸附开始，这种结合引起gp120构象发生改变，使病毒与其他细胞辅助受体(CXCR4或CCR5)相互作用。T细胞嗜性的合胞体诱导型病毒主要与CXCR4受体结合[16]；相反，巨噬细胞嗜性的非合胞体诱导型病毒主要与β趋化因子受体CCR5结合[17]。

HIV与宿主细胞融合后，进入宿主细胞并释放出RNA。HIV颗粒中包含在HIV复制过程中起关键作用的逆转录酶，该酶有3种不同的功能：RNA依赖的DNA聚合酶用于合成互补DNA(complementary DNA，cDNA)；RNA的核糖核酸酶H(RNase H)降解cDNA-RNA复合物中RNA；DNA聚合酶形成cDNA互补链的DNA。逆转录产生的基因组与几个相关病毒蛋白被转运到细胞核，再由病毒编码的整合酶将病毒双链DNA整合到感染细胞的基因组中。整合的逆转录病毒DNA基因组称为前病毒(provirus)。cDNA是病毒RNA的模板。HIV转录激活及基

因表达受细胞转录因子及病毒调节蛋白如 Tat、Rev、Nef 和 Vpr 调控。调节基因 *tat* 和 *rev* 对病毒复制速率有明显影响,Tat 蛋白增加了长末端重复序列的转录,而 Rev 蛋白促进编码病毒结构蛋白的未剪接或部分剪接 RNA 的输出。在复制周期的最后,病毒颗粒完成组装并通过细胞膜出芽释放。

三、流行病学和传播

(一)流行病学

HIV 自大规模流行以来,已累计造成全球约 7610 万人感染。2016 年,全世界新发生 HIV 感染超过 180 万人,估计存活 HIV 感染人数为 3670 万[18]。

世界上几乎每个国家都有 HIV-1 感染的报道。大多数 HIV 感染是由 HIV-1 M 组病毒引起的,其中 C 亚型病毒最常见,B 亚型病毒主要在美国、欧洲和澳大利亚流行,但在以 A、C 和 D 亚型病毒流行为主的非洲却很少见。HIV-2 主要发现于非洲西部国家,有 100 万~200 万人感染了 HIV-2。近年来,在一些与西非有历史和社会经济关系的国家也有 HIV-2 感染的报道,包括巴西、法国、葡萄牙、印度和其他有来自 HIV-2 流行地区移民的国家[19]。2017 年,约 2090 万 HIV 感染者获得抗逆转录病毒治疗,由此全部 HIV 感染者中有 53%(39%~65%)的患者获得治疗[18]。

美国疾病预防与控制中心(Centers for Disease Control and Prevention,CDC)估计,至 2014 年底,美国约有 120 万人感染 HIV。HIV 感染者的人口学特征不断发生变化。目前,美国 CDC 估计的每年新发 HIV 感染者包括已确诊的和未诊断的。2016 年,新诊断 HIV 感染者 39 782 例,2011—2015 年,每年新诊断的 HIV 感染者的数量下降 5%。

男男性行为人群依然是美国 HIV 感染最主要的人群。2016 年,同性恋和双性恋男性占全部新诊断 HIV 感染者的 67%(26 570),占新诊断男性 HIV 感染者的 83%。诊断 HIV 感染者中黑人/非裔美国同性恋者和双性恋者人数最多(10 223),其次是西班牙裔/拉丁裔(7425)和白人(7390)的同性恋和双性恋者。2016 年,异性性接触者占诊断 HIV 感染者的 24%(9578)。注射毒品者占 9%(3425)(其中 1201 例为注射毒品的同性恋和双性恋男性)。总体而言,2011—2015 年,女性人群中诊断 HIV 感染下降了 16%,异性性接触者中诊断 HIV 感染下降了 15%,与此类似,注射毒品者中诊断 HIV 感染也下降了 17%[20]。

(二)传播

HIV-1 和 HIV-2 的传播模式相同。最常见的模式是性接触时生殖道黏膜直接接触感染性体液,包括血液、精液和阴道分泌物[21]。HIV 也可以通过输入感染性血液传播,包括通过输入感染性血制品、接受感染器官移植、HIV 感染的母亲在分娩时感染其婴儿及重复使用被污染的注射针头等。职业性皮肤暴露于 HIV-1 感染性血液时感染风险估计为 0.3%[22]。

绝大多数 HIV 母婴传播发生在资源匮乏的国家。有证据表明,母亲血液和生殖道体液中的 HIV-1 DNA 的水平与母婴传播密切相关[23]。HIV 传播可以发生在子宫内、分娩及哺乳期间。在无治疗干预的情况下,母婴传播的风险是 15%~30%,母乳喂养会进一步增加传播风险。然而,妊娠和分娩期间给予抗逆转录病毒治疗,可使母婴传播的风险下降到 2%以下[24]。新生儿出生后,立即接受抗逆转录病毒治疗也能有效降低新生儿感染 HIV-1 的风险。

四、临床意义

(一)HIV 感染过程中的病毒学参数

HIV-1 感染的自然病史可以分为 3 个阶段:原发感染期的短暂急性逆转录病毒综合征;无症状期,在此期间病毒持续活跃复制及疾病进展;疾病晚期的严重免疫功能紊乱和免疫缺陷综合征(简称艾滋病)。每个阶段都有特异性的病毒学和免疫学参数改变。人感染 HIV-1 后,血液中 HIV-1 特异性标志物出现的顺序依次为:HIV-1 RNA、p24 抗原、HIV-1 IgM 抗体和 HIV-1 IgG 抗体(图 84-2)。上述标志物被检测到的准确时间取决于一系列因素,包括感染病毒的特点、检测试验的类型及宿主的免疫反应。HIV-1 发生暴露和传播后,病毒立刻在黏膜层、黏膜下层和淋巴网状内皮细胞组织中复制,此时血浆中还不能检测到病毒。

这个时期称为潜伏期，一般持续5～33天，估计中值时间约为11天[25-26]。当HIV-1 RNA浓度达到1～5拷贝/ml时，可被敏感的定性核酸扩增方法检测到，当浓度达到50拷贝/ml(译者注：目前商品化的HIV定量检测方法检测下限已经达到20拷贝/ml)时，即可通过病毒载量的定量试验检出。HIV-1 p24抗原是下一个可以在血液中检测到的标志物[25,27]。但p24抗原检测期很短，随着抗体的出现，抗体会与p24抗原结合形成免疫复合物，并干扰p24抗原的检测，除非检测试验包含了裂解抗原-抗体复合物的步骤。随着血液中p24抗原的增加，IgM类抗体产生[25,27]。最后，IgG类抗体出现，并在整个HIV感染过程中持续存在。HIV感染后，不能检测到抗体的时期称为窗口期。在大多数感染者中，感染后1～2个月即可检测到HIV抗体。图84-2所示的是以血浆为检测样本，不同检测方法检测到病毒标志物时的估计暴露天数(中位数，第25、75和99百分位数)。

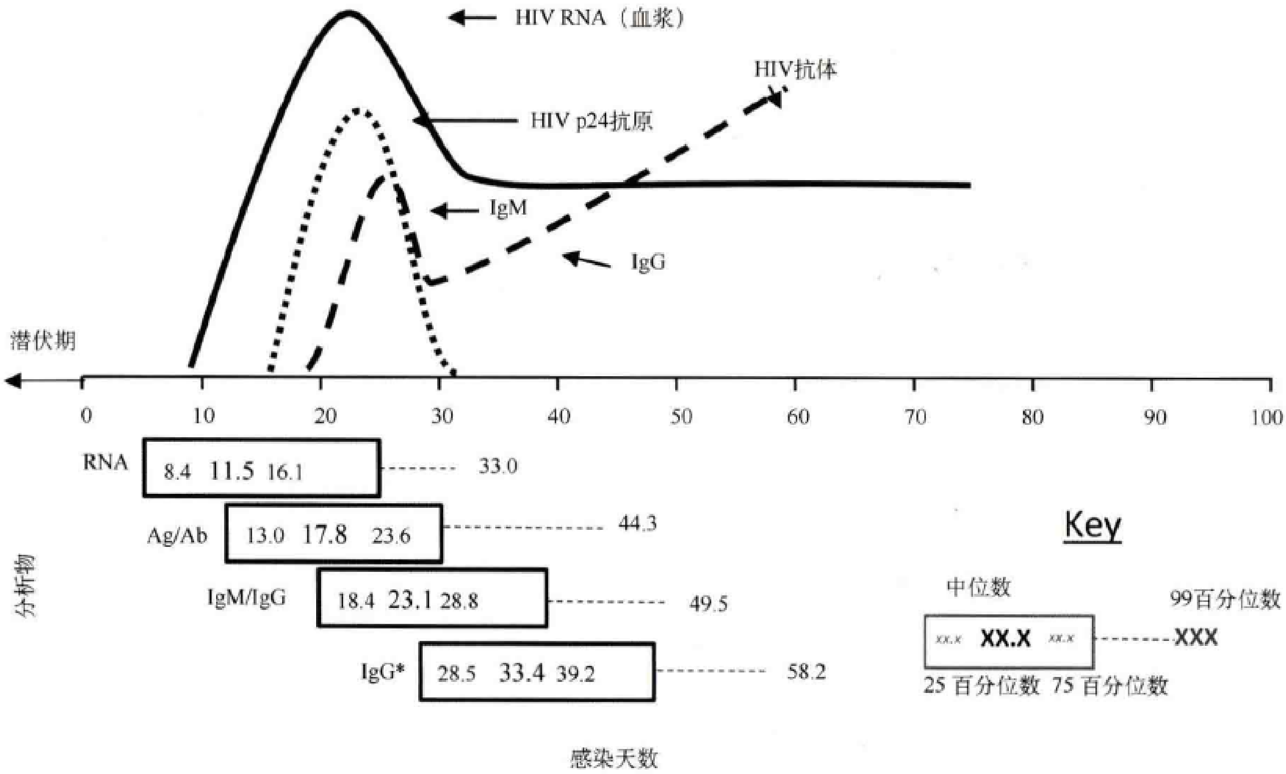


图84-2 实验室可检测的HIV-1感染标志物出现的时间顺序(中位数，第25、75和99百分位数)。因为RNA、抗原、抗体的数量级不同，纵轴未标出单位。本图出自参考文献[84]，数据更新来自参考文献[25][27][91]和[102]

(二)急性逆转录病毒综合征

50%～70%的HIV感染者在感染后3～6周内出现急性临床症状，此阶段常常检测不到抗体。急性HIV感染的短暂症状通常持续7～14天，与HIV-1高水平复制及病毒特异性免疫反应过程有关。急性HIV-1感染曾被描述为类单核细胞增多症，临床症状包括发热、斑丘疹、口腔溃疡、淋巴结病、全身乏力、体重减轻、关节痛、咽炎和盗汗等[28-30]。HIV-1急性感染期间，血浆病毒水平增加，HIV-1 RNA拷贝数可高达每毫升血浆10^8拷贝[31]。HIV-1特异性$CD4^+$ T淋巴细胞被破坏，病毒广泛播散到淋巴器官和其他组织储存库。在原发感染缓解期，$CD4^+$ T细胞数量反弹且病毒血症下降并达到一稳定水平，即病毒调定点。病毒调定点反映了病毒持续复制和免疫系统损害，是一个反映预后的重要指标[32-33]。出生前感染的婴儿，HIV-1 RNA变化模式与成人感染的不同：在HIV-1感染儿童，高水平的病毒RNA水平可能持续更长时间。

(三)临床潜伏期

在大多数HIV感染者，无论原发感染阶段伴随或不伴随急性症状，之后都会出现一个长时间的临床潜伏期或无症状期。在未治疗的患者中，从最初感染发展到临床免疫缺陷疾病阶段的时间

差别很大，平均为 10 年。在此无症状的阶段，HIV 持续活跃复制，CD4⁺ 淋巴细胞数逐渐下降，疾病持续进展，在淋巴器官和其他组织中可以检出高滴度的病毒[34]。HIV 感染快速进展者可以在感染 1～2 年内进入 AIDS 期。相反，5%～10% 的感染者属于长期不进展者，可保持无症状长达 20 年以上[35]。约有 0.5% 的 HIV 感染者能够在未经抗病毒治疗情况下，自发控制病毒在检测水平以下，称为精英控制者。

(四) AIDS 期

在未经治疗的情况下，HIV-1 在感染细胞中不断复制，伴随宿主细胞的清除及慢性免疫激活，最终导致免疫系统的破坏。HIV-1 复制动力学研究显示，在感染淋巴细胞中，从发生感染到产生病毒，乃至细胞死亡之间的间隔非常短。HIV-1 血浆中的半衰期为 6 h，在 $CD4^+$ 淋巴细胞中的复制周期大约为 2.6 天，每天约有 3500 万 $CD4^+$ 淋巴细胞死亡[36]。因为宿主清除产毒感染细胞的能力下降，$CD4^+$ 淋巴细胞中整合的前病毒不断累积，这些静息的 $CD4^+$ 淋巴细胞是 HIV-1 长寿命的储存库。病毒储存库衰减缓慢（平均半衰期 44 个月），即使经过治疗后，长达 7 年或更长时间检测不到病毒血症的患者也是如此[37]。HIV 感染的临床表现几乎影响到所有器官系统，免疫系统破坏临床表现为发生机会感染和肿瘤，中枢神经系统也会出现损害，最常见的是 HIV 相关痴呆[38]。当 $CD4^+$ 淋巴细胞数量下降到 200 个/μl 时，标志着免疫缺陷的到来，预示着患者易出现由病毒、细菌、真菌和原核生物等引发的机会性感染，乃至发生肿瘤、HIV 脑病、消耗综合征及进行性多灶性白质脑病，常造成患者死亡。

儿童感染 HIV-1 的过程和临床特征与成人不同。垂直传播的婴儿疾病进展快。儿童中最常见的 AIDS 特征性临床表现包括耶氏肺孢子菌（*Pneumocystis jirovecii*）肺炎和复发性细菌感染。

CDC 和 WHO 等公共健康组织已经发布了用于公共健康监测的人类免疫缺陷病毒病分类系统。所有 HIV 诊断病例都需要实验室确认的 HIV 感染证据。目前 CDC 分类系统对成人和儿童 HIV-1 感染的分为 5 期（0 期、1 期、2 期、3 期和不确定期）。0 期代表早期感染，定义为有 HIV 阳性检测结果前 180 天之内有 HIV 阴性或不确定的检测结果。判定 0 期可以通过既往检测（1 次阴性或不确定结果后的阳性结果），或者通过实验室检测证明存在 HIV 特异性病毒标志，如 p24 抗原或核酸（RNA 或 DNA），同时抗体检测结果为阴性或不确定。1、2、3 期的分类依据是年龄特异性 $CD4^+$ T 淋巴细胞计数，或者反映疾病严重程度的 $CD4^+$ T 淋巴细胞百分率（表 84-2）。没有 $CD4^+$ T 淋巴细胞计数或百分率检测结果的个体判定为不确定期[64]。

表 84-2 HIV 感染分期（根据年龄特异性 $CD4^+$ T 淋巴细胞计数或总淋巴细胞中 $CD4^+$ T 淋巴细胞百分率）

分期[a]	$CD4^+$ T 淋巴细胞计数测定时的年龄					
	<1 岁		1～5 岁		6 岁至成年	
	$CD4^+$ T 淋巴细胞计数(个/μl)	$CD4^+$ T 淋巴细胞百分率(%)	$CD4^+$ T 淋巴细胞计数(个/μl)	$CD4^+$ T 淋巴细胞百分率(%)	$CD4^+$ T 淋巴细胞计数(个/μl)	$CD4^+$ T 淋巴细胞百分率(%)
1	≥1500	≥34	≥1000	≥30	≥500	≥26
2	750～1499	26～33	500～999	22～29	200～499	14～25
3	<750	<26	<500	<22	<200	<14

注[a] 分级是以 $CD4^+$ T 淋巴细胞计数为依据的，只有结果缺失时，才用百分率。0 期定义为获得 HIV 阳性结果 180 天以内有 HIV 阴性或不确定结果，没有 $CD4^+$ T 计数或百分比的定义为分期不确定

(五) 治疗和疫苗

在过去的 25 年里，人们在如何有效开展抗逆转录病毒治疗方面取得了重要的科学进展。1987 年 3 月美国 FDA 批准了第一种有效的抗 HIV-1 药物齐多夫定（zidovudine），目前，美国 FDA 已批准 30 多种的抗逆转录病毒药物或合剂用于 HIV 感染治疗（美国 FDA 批准药物清单参见 www.aidsinfo.nih.gov）。目前获准用于治疗 HIV 感染的抗病毒药物分为 5 类：核苷类逆转录

酶抑制剂(nucleoside RT inhibitors)、非核苷类逆转录酶抑制剂(nonnucleoside RT inhibitors)、蛋白酶抑制剂(protease inhibitors)、整合酶抑制剂(integrase inhibitors),以及进入和融合抑制剂(entry and fusion inhibitors)。成人和儿童的用药参考指南发展迅速,定期更新,最新的指南可以在AIDSinfo(http://aidsinfo. nih. gov)上获得。

抗 HIV-1 疫苗研发遇到了一些影响研发工作进展的障碍,包括 HIV-1 无法诱导产生能够中和同期病毒的中和抗体、对保护性免疫相关因素的了解不足,以及病毒基因的多样性和动物模型的限制等[40-41]。然而,近年来以广谱中和抗体为基础设计的双特异性分子作为双重亲和重定向分子(DART),有望在纳克范围内发挥有效的抗病毒活性。确定真正的临床功效需要未来进行动物和人体试验[42]。

五、标本的采集、储存和运输

实验室最常采用血清和血浆标本进行 HIV 抗体和抗原检测。采集血浆常用含有 EDTA 钾、柠檬酸钠、肝素钠或肝素锂的采血管,或者血浆制备管(plasma preparation tubes,PPTs)。采血后,需迅速将血浆或血清从凝块和细胞中分离出来,这对于减少溶血及最大限度地保持检测标本的活性非常重要。血清或血浆标本分装在螺口管中,可以在室温、冷藏或冷冻条件下运输(去除细胞成分后)。用于抗体免疫检测的血清或血浆标本必须在 2~8℃或室温条件下(≤37℃),7 天内完成运输。HIV 抗原抗体联合检测的标本应更加严格限制室温下保存的时间,以有利于保护 p24 抗原。截至 2017 年 6 月,在美国抗原抗体联合检测试验用的标本在室温下最长保存 48~72 h,或在 2~8℃条件下保存不超过 7 天。无论在哪种温度下,把样本运输时间计入最大允许保存时间都非常重要。需要长期储存的血清或血浆标本需冷冻在−20℃或更低的温度下。

部分 HIV 抗体检测可采用干血斑、唾液或尿标本,另一些快速 HIV 检测试验可采用针刺指尖全血、静脉全血或唾液标本。上述替代标本的采集设备、程序和储存条件需按照上述产品生产商的说明书要求。

HIV-1 RNA 病毒载量定量检测最常采用血浆标本,一般以 EDTA 钾或枸橼酸盐(acid citrate dextrose,ACD)抗凝。肝素抗凝剂会抑制 PCR 反应,不宜用于任何与 PCR 扩增有关的核酸检测。为保证准确定量血浆中的 HIV-1 RNA,标本的合理收集、处理、储存和运输都很重要。血浆标本应及时与血细胞分离,防止 RNA 降解。根据特定试验,生产商在试剂说明书中明确要求,全血离心前可在室温下放置 6~24 h,或在 2~8℃放置 24 h。HIV-1 RNA 在无细胞的血浆中比较稳定,在 2~8℃条件下可稳定存在 5~7 天。长期储存时,血浆标本应冷冻在−70~−20℃。HIV-1 RNA 冻融次数在 3 次以内可保持稳定。

为了简化血浆标本收集和运输过程,可以采用血浆准备管(plasma preparation tubes,PPT)(BD Vacutainer PPT; Becton Dickinson),这种采血管包含 EDTA 干粉和分离胶,离心后能在血浆与细胞成分间形成分隔,并能提供一个血浆标本制备和运输的封闭收集系统。离心后不需要从 PPT 中吸出血浆标本,省去了血浆转移和再标记的步骤,从而提高便利性,减少出错风险并提高安全性。制造商建议,离心后的 PPT 可以冷藏或冷冻运输。然而,有报道称,血浆标本经过一些检测和某些条件处理后(如离心后冷冻、存量不足和离心不当)可造成病毒载量检测结果不一致[43-46],但这种差异仅见于病毒载量接近试验检测限的标本。很大一部分标本用标准 EDTA 管采集时检测不到病毒载量,而采用 PPT 采集标本时却可检出 HIV-1 RNA,因此,制造商曾建议 PPT 中血浆不宜冻存;如果血浆标本需要冷冻储存时,需将血浆转移到第二支管中。每种经美国 FDA 批准的病毒载量检测试剂盒都有特定的体积、收集管和储存要求,因此应使用包装说明书来明确标本的最佳收集和处理方法。

连续监测患者的病毒载量时,应使用相同的标本采集系统和程序,因为不同的系统可能产生差异值。例如,用 ACD 管收集的标本比 EDTA 处理的血浆标本测定值低约 15%[45,47]。如果计划改变采集系统和检测方法,应该确定新的 HIV-1 病毒载量基线值。

实验室在检测儿童患者的标本时,应注意标本体积的灵活性。因为对于儿童患者,采集到某些试验所需的 1 ml 血浆是很困难的。病毒载量试验除了测定血浆标本以外,还可测定血清、干血

斑、脑脊液、子宫颈分泌物和精浆中的 HIV-1 RNA[46]。血清中 RNA 定量比相应血浆中 RNA 测定值略低；采用血浆以外的其他标本时，必须确认其有效性，因为这些标本不包含在美国 FDA 批准的病毒载量试剂盒的标本类型中。

HIV-1 RNA 定性试验可用血浆和血清标本。美国 FDA 批准的定性诊断试剂盒 APTIMA（Hologic Gen-Probe Incorporated）采用的血液标本可以收集在玻璃杯或塑料管中，EDTA、ACD、枸橼酸钠、EDTA PPT 或血清管均可以采用。该试验的全血标本在 25℃以下可保存 72 h，30℃以下最多保存 24 h，标本离心后在 2～8℃可再保存 5 天，血浆与细胞分离后在 -20℃以下可保存更长时间。

用于 HIV-1 抗逆转录病毒药物耐药检测（基因型和表型）的血浆标本，可以使用 EDTA、ACD 或 EDTA PPT 管采集。血浆必须在采血后 6 h 内与细胞成分分离并冻存，防止 RNA 降解。缩短离心前时间和冷冻处理样品有助于获得高质量的标本。为了得到理想的检测结果，血浆标本应冷冻运输并冷冻于 -70℃。对于 HIV-1 DNA 和病毒培养检测，通常使用全血，血液应收集在 EDTA、ACD 或细胞准备管。当制备外周血单个核细胞用于 HIV DNA 扩增试验时，所采集的血液标本不宜冷藏或冷冻，而应在室温下保存不超过 4 天。

六、直接检测

（一）p24 抗原检测

在 AIDS 流行早期，p24 抗原测定在诊断、预后及评价抗病毒治疗效果和测定 HIV-1 感染培养物方面曾发挥重要作用。1996 年美国 FDA 批准了用于筛查血制品的 Coulter HIV-1 p24 抗原检测试剂盒（Coulter Co.，Miami，FL）。美国曾用该方法筛查全血及血浆捐献者数年时间，直到 1999 年被更敏感的核酸检测试验（nucleic acid tests，NATs）替代[57]。目前，p24 抗原检测在美国已经很少单独应用。血清或血浆标本中的 p24 抗原可用抗原捕获的酶联免疫吸附试验（enzyme immunosorbent assay，EIA）测定。由于干扰物质和免疫复合物的存在，p24 抗原检测可能产生假阳性结果，因此，阳性标本需要通过中和试验进行确认[58]。在 HIV 感染后的最初两周通常检测不到 p24 抗原，在急性感染期，p24 抗原先于 HIV-1 抗体出现（图 84-2）。然而，p24 抗原检测期非常短，由于 HIV-1 抗体开始形成，会与 p24 抗原结合形成免疫复合物，干扰 p24 抗原检测，除非试验中包括能够裂解该抗原抗体复合物的步骤[59-60]。目前 HIV-1 的抗原试验已经得到改进，包括用酸或热进行处理解离抗原抗体复合物[60-63]，并且通过信号放大作用提高试验的敏感性[62]。有报道热变性结合酪胺信号放大能够将 p24 抗原检测的敏感性提高到 PCR 检测 RNA 的水平，当条件有限无法进行核酸检测时，可用该方法监测抗病毒治疗的效果[64-66]和儿科诊断[67-68]。

（二）HIV RNA 和 DNA 定性检测

临床上，Aptima 的 HIV-1RNA 定性检测可用于识别急性 HIV-1 感染和新生儿 HIV-1 感染，也可对 HIV 抗体有重复性反应的患者标本进行 HIV-1 感染的确认。此方法同时检测 HIV-1 长末端重复序列和 *pol* 基因 2 个靶区，可检测 HIV-1M 组、N 组和 O 组所有病毒。试验包含 3 个基本步骤：从临床标本中特异性捕获 HIV-1 RNA，转录介导的扩增，以及利用杂交保护试验进行检测。该方法对血浆标本的检出限为 30 拷贝/ml，特异性为 99.8%。

在特定条件下，HIV-1 DNA 检测也可用于 HIV 感染诊断，如在抗体尚未出现的急性感染期、母婴传播感染的新生儿、由于免疫控制或抗病毒治疗而使病毒得到控制的个体。HIV-1 DNA 定性试验采用 PCR 方法扩增 HIV-1 基因组的保守区，从而测定外周血单个核细胞中的 HIV-1 前病毒 DNA。目前，还没有美国 FDA 批准可用于前病毒 DNA 检测的商品化试剂盒，但也有实验室自建巢式 PCR 和实时定量 PCR 方法检测 HIV-1 DNA。上述方法的检测限及检测非 B 亚型的能力差别很大。据报道，标准 HIV-1 DNA PCR 试验检测出生一个月内 B 亚型 HIV-1 感染新生儿，敏感性和特异性分别为 96% 和 99%[69]。随着流程简便且敏感的干血斑检测方法的发展，大大提高了 DNA PCR 定性试验在 HIV-1 垂直传播诊断中的应用潜力。

（三）HIV RNA 病毒载量检测

病毒载量检测是定量测定血浆中 HIV-1 RNA

含量的方法，用于估计预后、监测治疗效果及判断传染性[33,70]。HIV-1 病毒载量最常用于指导治疗决策，但是由于病毒载量与潜在病毒传播可能性有关，也用于指导以治疗为预防(treatment as prevention)的干预策略[71]。美国 FDA 通过了 4 个血浆 HIV-1 RNA 定量测定的商品化试剂盒。表 84-3 中比较了不同试验的标本要求及试验特点。目前尚无检测 HIV-2 病毒载量的试剂盒。

表 84-3 美国 FDA 批准的病毒载量试剂盒及标本要求[a]

试剂盒名称和制造商	扩增方法靶基因	抗凝剂	血浆量	检测范围(拷贝/ml)	标准与质控
Aptima HIV-1 Quant (Hologic Inc., Marlborough, MA)	TMA	EDTA、ACD	240 μl + 稀释液 700 μl	30~10 000 000	3 个外部对照，1 个内部定量标准，1 个内部校准
CobasHIV-1 (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN)	实时 RT-PCR LTR，*gag* 基因	EDTA	200 μl	50~10 000 000	1 个内部定量标准
			500 μl	20~10 000 000	3 个外部对照
Cobas AmpliPrep/Cobas TaqMan 2.0 版 (Roche Diagnositic, Indianapolis, IN)	实时 RT-PCR LTR，*gag* 基因	EDTA	1 ml	20~10 000 000	1 个内部定量标准，3 个外部对照
实时定量 HIV-1 (Abbott Molecular, Des Plaines, IL)	实时 RT-PCR 整合酶基因	EDTA、ACD	200 μl 500 μl 1 ml	40~10 000 000	1 个内部对照，3 个外部对照，每个新批次或每 6 个月更新校准曲线

注：[a]TMA. 转录介导的扩增

与传统的病毒载量试剂盒相比，近期的核酸检测试剂盒有以下几点优势：更宽的线性范围、自动化程度更高、污染风险更低。实时定量 HIV-1 试剂盒采用 m2000 自动化系统，该系统由 2 部分组成：m2000sp 部分用于核酸提取、将样品及主反应混合物加入 96 孔反应板中，m2000rt 部分则用于模板的扩增和检测。该试验以一段无关的 RNA 序列内部对照，在核酸提取之前加入到标本裂解缓冲液中。RNA 由磁珠捕获，洗涤去除未结合的物质，再将 RNA 洗脱下来。主反应混合物与 RNA 在反应板中结合，将反应板封盖并加载到 m2000rt 部分是试验中仅有的手动步骤。扩增和检测采用 TaqMan 技术，HIV-1 的寡核苷酸探针是一种部分双链的复合物，长链与 HIV-1 靶区(整合酶)互补，并在 5′端有荧光标记，短链与长链的 5’端互补，并在 3’端标记淬灭基团。当 HIV-1 靶基因存在时，HIV-1 特异性链优先与靶基因杂交并发射荧光[72-73]。计算病毒载量值时，两个试验校准器运行 3 次生成一个校准曲线；曲线的斜率和截距都储存在仪器中，用于载量值的计算。该方法的检测下限是 1 ml 标本 40 拷贝/ml，0.5 ml 标本 75 拷贝/ml，0.2 ml 标本 150 拷贝/ml。实时定量 PCR 试验已经优化，可用于所有 M 组、N 组、O 组及流行重组型病毒的检测[72,74]。

CobasAmpliPrep/Cobas TaqManHIV-1 试验 2.0 版也是基于实时 TaqMan 技术，靶基因是 LTR 和 *gag* 两个基因区。核酸提取过程在 Cobas AmpliPrep 仪器上，采用基因磁性微球捕获方法自动完成，裂解缓冲液中加有已知浓度的定量标准(quantitation standard，QS)，并以已知浓度随裂解液加入每份检测标本中。提取的标本及反应混合物加入 AmpliPrep 仪器的扩增反应管中，扩增和检测在 CobasTaqMan 分析仪或 Cobas TaqMan 48 分析仪上完成。Cobas TaqMan 分析仪可对接到 AmpliPrep 仪器，组成完整的自动化系统，也可采用手工方法将扩增管转移到 CobasTaqMan 48 分析仪中。计算病毒载量值时，仪器软件会检查 QS 及靶基因的荧光读数，确保其有效性，确定交叉阈值，并根据制造商提供的批次特异性常数计算出病毒载量值。加入到每份标本中的 QS 量是恒定的，所以如果 QS 的临界阈值调整，HIV-1 靶基因的浓度也随之改变。Cobas AmpliPrep/Cobas TaqMan HIV-1 试剂盒可以检测所有 M 组病毒，包括流行重组株病毒，并能检测 O 组及 N 组病毒[74-76]。

最近，罗氏的新平台 Cobas 6800/8800 获批，该平台提供了一个集成的工作流程，降低了手工要求。这些系统可进行混合批处理，使其能够在同一运行中进行多达 3 次检测，而无须预先准备样本，因此样本可以用于检测除 HIV 之外其他病

原体共感染。截至 2017 年,该平台可处理 500 μl (需 650 μl)及 200 μl (需 350 μl)多种不同体积的 EDTA 血浆。这个平台与 AmpliPrep/Cobas TaqMan HIV-1 一样,使用双靶设计,当使用 500 μl 体积 EDTA 抗凝的血浆时,报告的线性范围为 20～10^7 拷贝/ml,检测限(limit of detection,LOD)为 13.2 拷贝/ml,当使用 200 μl 体积时,报告的线性范围为 50～10^7 拷贝/ml,LOD 为 35.5 拷贝/ml。

2017 年 1 月,美国 FDA 批准了 Hologic 的 Aptima HIV-1 定量检测试剂,在全自动 Panther 系统上定量检测 HIV-1 感染者血浆中的 HIV-1 RNA。Aptima 试剂能够从 700 μl 的血浆中定量检测 M 组、N 组和 O 组 HIV-1RNA,范围为 30～10 000 000 拷贝/ml。该方法利用转录介导扩增,包括双靶点扩增和检测系统,分别针对 HIV-1 基因组的 2 个区域(pol 和 LTR),每个区域产生一个独立的信号,使 2 个区域的突变影响最小化。比较分析发现,CE 批准的 Aptima Quant 与 Abbott Real-time 和 Roche Cobas AmpliPrep/Cobas TaqMan 具有高度一致性[77]。与此前的研究一样,不同检测试剂之间的最大变异性在于动态范围的低端,接近定量的下限[72-76]。尽管根据包装说明书,CE 批准的检测方法和美国版本的检测方法几乎没有区别,但由于刚获得美国 FDA 批准,目前还没有已公布的关于美国 FDA 批准的检测方法性能的研究。

由于核酸检测存在费用高、技术要求复杂的缺点,需要研发其他类型的病毒定量检测方法,以满足资源有限条件下标本检测的需要。热变性信号增强 p24 抗原测定法(Perkin Elmer, Wellesley, MA)和 RT 测定法(ExaVir 载量试验,Cavidi AB, Uppsala, Sweden)[78-79]就是为此类目的研发的 2 种方法。尽管这 2 种方法敏感性及可重复性都低于基于核酸检测方法,但其可作为替代 HIVRNA 定量检测的费用相对低廉的方法。此外,HIV-1 核酸定量床旁检测方法也正在努力研发过程中,虽然美国 FDA 还没有批准此类检测,但在美国以外的地方已经开展[80]。

七、病毒分离

因为从大多数 HIV 感染者的血液中可以分离出病毒,在早期,病毒培养常用作诊断、预后的标志,或用来评价抗病毒治疗的效果[33,48]。HIV 培养程序复杂且耗时[49],虽然阳性培养结果能够提供感染的直接证据,但 HIV 病毒培养主要用于实验室研究而非常规诊断。为了分离 HIV 毒株,首先需将患者标本与经过植物血凝素和白细胞介素-2 刺激的健康人细胞进行混合培养,因 HIV-1 能够引起细胞死亡,每周还必须补充新鲜刺激的供者细胞。第二步,定期检测培养上清液中的逆转录酶或 p24 抗原,通常每 3～7 天检测 1 次,培养周期大约为 1 个月。

病毒培养试验还用于 HIV-1 表型耐药测定及确定病毒适应性[50]。基于重组 DNA 技术和血浆 RNA 扩增技术的表型耐药试验已经不再依赖病毒株分离[51]。Monogram BioSciences 公司(South San Francisco, CA)已经研制出一种商品化的病毒适应性试验,又称 HIV 病毒复制能力测定(Replication capacity assay)。RC 试验是体外测定正在接受抗逆转录病毒治疗患者体内病毒与野生型参考株相比的复制能力。患者的 RC 值用野生型参考标准 RC 值的百分比来表示。该试验采用由 HIV-1 感染克隆构建的逆转录病毒载体,在载体缺失的 *env* 基因区中插入荧光素酶表达基因[52],从患者血浆标本中扩增 HIV-1 蛋白酶及逆转录酶基因序列,插入到载体中,将来自患者的病毒产生的荧光素酶量与野生型参考病毒相比较。有人建议将 RC 作为一种抗病毒治疗决策的补充指标。对于携带多个耐药突变,但病毒载量并未增加的患者,其病毒株的 RC 降低[52-53]。此外,有资料表明一些耐药突变能使 RC 降低[54-55],而一些 HIV 病毒控制者的 RC 也较低[56]。

八、血清学试验

HIV 感染诊断通常首先采用敏感的免疫初筛试验筛查 HIV 抗体,再以补充试验进行确认[81]。因为 HIV 感染一般会伴随感染者终生,并且感染者初期的症状很轻,大多数人是在临床潜伏期或疾病终末期通过抗体检测明确感染。HIV 抗体免疫学试验快速且经济,主要的不足之处在于存在窗口期,即从发生感染到能检测到抗体表达的时间[27]。在窗口期内,病毒活跃复制,患者存在高水平病毒血症。不同类型的抗体免疫学检测窗口期不同,但所有基于抗体检测的试验都会漏检早期

感染。人们已经意识到急性感染者比已建立感染者(established infection)的传播风险高得多[82]，且抗病毒治疗可使急性感染者临床获益[83]，这些都推动了HIV感染早期诊断技术的应用。美国FDA已批准HIV抗原-抗体联合免疫检测和HIV-1核酸检测用于HIV感染的早期诊断，这些方法在HIV诊断中的作用越来越重要。

(一)初筛试验

自1983年HIV被发现以来，HIV免疫检测技术已经取得了很大进步。表84-4总结了目前的检测方法，将不同设计原理的免疫检测方法分为几代。由于每一代术语变得越来越难以描述，因此本章中根据检测到的分析物来描述检测方法。最早的免疫检测方法是间接EIAs法，即采用培养细胞裂解抗原包被固相(或固定)，捕获抗体后用抗人IgG结合物检测抗体，这些检测称为IgG敏感性检测。为了增加特异性，必须稀释标本以克服细胞蛋白交叉反应产生的污染；随后的免疫检测采用合成肽或重组蛋白抗原单独或与病毒裂解物联合来结合HIV抗体，采用标记抗人IgG或与IgG具有高亲和力蛋白A的间接免疫方式检测IgG抗体[84]，该免疫试验通过设计特异性抗原表位的方法提高了检测HIV-1、HIV-1 O组和HIV-2的敏感性，有助于更早地检测到IgG抗体[85]，同时去除病毒裂解物中的细胞抗原污染，消除了与细胞抗原的交叉反应性，提高了试验的特异性；为了感染过程中早期检测，采用合成肽或重组抗原来结合HIV抗体，但改用双抗原夹心方式，标本中HIV抗体与反应基质中的HIV抗原结合，并同时与标记指示分子的抗原结合，该方法可以检测IgM和IgG类抗体，这些检测称为IgM敏感性检测。标本稀释度更低并可检测IgM抗体(早于IgG表达)，进一步缩短血清转换早期的窗口期[25,86-87]；为了使检测更接近感染时间，免疫检测仍沿用合成肽或重组蛋白抗原的夹心方式来检测IgM和IgG类抗体，但增加了检测p24抗原的单克隆抗体，p24抗原检测可以在HIV-1感染血清转换前检出HIV感染[25,88-91]，大多数抗原/抗体免疫试验(称为“联合”试验)不区分抗原反应和抗体反应。然而，2015年7月，美国FDA批准了一种新的实验室抗原/抗体联合检测试剂，即BioPlex 2200 HIV Ag-Ab，旨在同时检测和区分HIV-1感染和HIV-2感染，包括HIV-1 p24抗原，抗HIV-1(M组和O组)包膜抗体和抗HIV-2包膜抗体。

通过检测血清转换盘样本，可建立不同免疫测定方法的大致检测时间，根据多个数据源估计的示意图如84-4所示[25,27,85,89,92]。

表84-4 FDA批准的实验室HIV免疫学检测方法

试验	检测标记物	分析物检测
传统EIAs		
Avioq HIV-1 Microelisa系统	病毒裂解液，原始gp160	IgG抗体
Bio-Rad GS HIV-1/2PLUS O试剂盒	重组p24抗原、gp160、HIV-2 gp36、O组合成肽	IgG和IgM抗体
Bio-Rad GS HIV Combo抗原/抗体酶联免疫吸附测定	合成gp41、重组gp160、HIV-2 gp36、O组合成肽、p24单克隆抗体	IgG和IgM抗体 p24抗原
化学发光试验		
Abbott人类免疫缺陷病毒	合成和重组gp41和HIV-2 gp36，O组合成肽、p24单克隆抗体	IgG和IgM抗体
抗原/抗体联合检测试剂盒		p24抗原
美国Ortho公司体外HIV 1+2抗体ELISA诊断试剂盒	重组p24、gp41、gp41/120、HIV-2 gp36	IgG和IgM抗体
西门子ADVIA Centaur HIV 1/O/2	重组gp41/120、p24、HIV-2 gp36、O组合成肽	IgG和IgM抗体
ADVIA Centaur HIV抗原/抗体联合(CHIV)检测试剂盒	HIV-1和HIV-2重组抗原、O组合成肽抗原、抗p24抗体 HIV-1和HIV-2重组env-和pol抗原、p24单克隆抗体	IgG和IgM抗体 p24抗原
罗氏公司HIV组合PT检测试剂盒		IgG和IgM抗体 p24抗原

(续 表)

试验	检测标记物	分析物检测
多重流式分析		
Bio-Rad BioPlex 2200 HIV 抗原/抗体检测试剂盒	重组 HIV-1gp160、O 组合成肽、HIV-2 gp36、p24 单克隆抗体	HIV-1 和 HIV-2 IgG 和 IgM 抗体、p24 抗原
Geenius HIV 1/2 确证试验测试剂盒	重组 gp36HIV-2 ENV、gp140HIV-2 ENV、p31HIV-1 POL、gp160HIV-1 ENV、p24HIV-1 GAG；gp41 M 组和 O 组 HIV-1 包膜合成肽	HIV-1 和 HIV-2 IgG 抗体

1. 常规免疫检测 实验室常用的常规免疫检测包括 EIA 和化学发光免疫试验(chemiluminescent immunoassay,CIA)。大多数常用试验包含可检测 HIV-1 M 组和 O 组及 HIV-2 的特异性抗原。HIV 抗原(和第四代试验中的抗 p24 抗体)吸附到固相(通常是反应板、珠或管),用于与标本中 HIV 抗体(或 p24 抗原)结合。抗体(或抗原/抗体联合试验,p24 抗原)与酶(碱性磷酸酶或辣根过氧化物酶)或吖啶酯结合。间接 EIA 试验使用一种酶标的抗球蛋白结合物,抗原夹心 EIA 和 CIA 使用酶标抗原结合物(或 p24 单克隆抗体)。EIA 试验结果是颜色改变,用分光光度计测定光密度值,值的大小反映标本中抗体(或抗原)的量。CIA 结果用相对光单位表示,信号与标本中抗体(或抗原)量成比例。测定结果与校准值相比较,当信号与临界的比值(signal-to-cutoff ratio)大于 1.0 时,判断为有反应性。EIAs 和 CIAs 都适合自动化操作。与 EIAs 相比,CIAs 的反应时间短且线性范围宽,已经发展成为随机访问的免疫化学平台,具备使 HIV-1 实验室检测更加简单、快捷的潜力。如上所述,最近在 HIV 检测市场上推出了一种新检测方法(BioPlex 2200 HIV Ag-Ab),旨在同时检测和鉴别与 HIV-1 和 HIV-2 感染有关的个体标志物,能够区分抗原和抗体的检测能力。该检测方法具有提高急性 HIV 感染检测水平的潜力。美国 CDC 目前有一个网站,重点介绍目前美国 FDA 的 HIV 诊断试剂的优缺点。该网站信息会定期更新,可以在 https://www.cdc.gov/hiv/pdf/testing/hiv-tests-advantages-disadvantages.pdf 上找到。

2. 快速免疫检测 常规的 HIV 免疫检测需要采血,通常在标本测定后还需要再次就诊取回检测结果,HIV 检测对于采血困难人群来说更加复杂,很多人不能回来取检测结果[93]。在某些情况下,当应立即开始抗逆转录病毒预防措施时,如在评估职业性血液或体液暴露后的暴露源患者及对艾滋病病毒感染状况未知的孕妇,快速 HIV 检测的结果在医学上是可取的[94-95]。为了满足这些需要,人们已经研发了适用于床旁检测和临床实验室的快速检测试剂。

HIV 快速免疫检测是采用免疫渗滤(穿流式)或者免疫层析(横流式)原理的一次性使用装置[96]。免疫渗滤试验要求标本、结合物、澄清缓冲液按顺序通过滤膜。免疫层析试验已经包括全部检测试剂,只要求加入标本或者标本和标本缓冲液,非常容易操作。快速免疫检测所需标本量(3～50μl 全血、血清或血浆)及反应时间(1～20 min)不同。根据《临床实验室改进修正案》(clinical laboratory improvement amendments,CLIA),可使用直接、未经处理的样本(全血或口腔液)进行的快速检测已被弃用,更适合在传统实验室环境之外使用。截至 2017 年 12 月,美国 FDA 批准了 9 项快速 HIV 抗体检测(表 84-5)。快速检测试验的不足包括:主观性解释,如果判读者有色盲等视觉问题可能会导致失误、或者操作者缺少经验时操作程序上出现失误[97-98]。操作时必须保证标本体积精准,且在特定的时间限制内判读结果,一定要观察到对照线,以及必须严格按照说明书操作。快速检测主要适用于少量标本检测,同时检测多个标本时,有精确时间要求的操作步骤会受到不良影响。但是当临床需要快速提供检测结果或者在条件不具备的情况下,HIV 快速检测仍是一个有用的方法[99]。

已有研究表明,对于感染者,HIV 抗体快速免疫检测与实验室常规免疫检测的性能相似[99-100]。然而,绝大多数快速免疫检测是用结合有蛋白 A 的胶体金对 IgG 抗体进行检测,其检测血浆转换盘的敏感性与二代常规免疫检测相似[25,89,92]。比

表 84-5 FDA 认证的 HIV 快速检测试验

试验	制造商	标本类型	CLIA 类型	抗原代表	获得美国批准的 FDA 时间
Drasure 快速 HIV 1 型/2 型抗体检测	Orasure Technologies, Inc.	唾液、全血、血浆	弃用;中度复杂	gp41, gp36	2002
Reveal G3 HIV-1 抗体快速检测	MedMira, Inc.	血清、血浆	中度复杂	gp41, gp120	2003
Uni-Gold Recombigen HIV-1/2 检测	Trinity BioTech	全血、血清、血浆	弃用;中度复杂	gp41, gp120, gp36	2003
多点 HIV-1/2 快速检测	Bio-Rad Laboratories	血清、血浆	中度复杂	gp41, gp36	2004
Alere Clearview HIV 1/2 Stat Pak	Chembio Diagnostics	全血、血清、血浆	弃用;中度复杂	gp41, gp120, gp36	2006
Alere Clearview Complete HIV 1/2	Chembio Diagnostics	全血、血清、血浆	弃用;中度复杂	gp41, gp120, gp36	2006
INSTI HIV-1 抗体检测试剂盒	Biolytical laborator	全血、血清、血浆	弃用;中度复杂	gp41, gp36	2010
Chembio 双路径检测平台 HIV 1/2 检测	Chembio Diagnostics	唾液、全血、血清、血浆	中度复杂	gp41, gp120, gp36	2012
Alere Determine HIV 1/2Ag/Ab Combo	Alere Scarborough	全血、血清、血浆	中度复杂	gp41, gp120, gp36; p24 抗体	2013

较研究显示,快速免疫试验检测唾液、全血和血清标本时,检出的 HIV 感染患者数量少于传统的实验室免疫试验,在 HIV 早期感染率增加的人群中,唾液的敏感性低于全血或血清样本[101-102]。Alere Determine HIV Combo 是一种已经获得 FDA 批准的快速免疫试验,能检测和区分 HIV 抗体及 p24 抗原(表 84-5),其整体敏感性与 IgM(三代)免疫试验相似,对抗原成分的敏感性低于四代免疫试验[102-104]。

3. 用于抗体检测的其他(替代的)标本 唾液、尿或干血斑可以代替全血、血清或血浆,用于 HIV 抗体检测。在患者不愿接受采血或血管条件很差、大规模筛查不具备采血条件、婴儿及血清学调查研究等情况下,这些检测非常有用。针对特定的标本类型设计唯一的标本采集系统和检测方法,并验证其有效性是非常重要的。唾液是几种不同腺体分泌物的复杂混合物,也包括从牙龈和黏膜毛细血管中渗出的血浆。唾液腺主要分泌物含有分泌型 IgA,不是诊断试验的可靠靶标,唾液中的 IgG 大多来源于牙龈和牙齿之间的缝隙,并非来源于唾液腺或诱导产生的口腔黏膜渗出液。OraSure 是设计用来收集口腔黏膜渗出液的标本采集装置,可用于 FDA 批准的传统试验,如 HIV-1 EIA 唾液检测方法[105]。FDA 批准了两种检测唾液、全血和血浆标本的 HIV 快速检测方法。但唾液标本的免疫检测出现假阴性、假阳性结果,以及蛋白质印迹法不确定结果的频率均高于血清标本[101,106-108]。

干血斑经适当的稀释后,可用于检测 HIV 抗体、p24 抗原及 HIV RNA,检测结果与对应的血清或血浆标本相当[67,109,111]。尿中 IgG 的量比血清低。FDA 批准的 EIA 和蛋白质印迹法试验检测尿标本的敏感性和特异性均低于对应的检测血清标本的常规 EIAs[112]。

(二)非典型感染及 HIV-2 感染筛查

HIV-1 M 组和 CRFs 的流行有明显的地理差异。非洲撒哈拉沙漠以南地区可检出所有 HIV 亚型和多数 CRFs 毒株。B 亚型是美国、欧洲、加拿大和澳大利亚的主要流行毒株,不过上述国家的非 B 亚型毒株流行正在上升。在美国,非 B 亚型 HIV 感染者占 3%~5%[113,115]。目前的 HIV 免疫试验能有效检出绝大多数的 HIV-1 M 组的 B 亚型及非 B 亚型病毒感染者[115-116]。美国只报道了 3 例 O 组病毒感染者,3 例均与非洲中、西部存在联系。如果不包含特异性检测 HIV-1 O 组病毒抗体的试剂成分,免疫试验会漏检 O 组 HIV-1 感染者[117]。

由于 HIV-1 抗原与 HIV-2 抗体存在交叉反应,检测 HIV-1 抗体的特异性免疫试验也可检测到 HIV-2 感染。但是,以仅针对 HIV-1 的免疫试验检测 HIV-2 感染时,结果差异很大,根据采用试验的不同,检出 HIV-2 感染者的效率为 51%~100%[92]。为获得管理机构的批准,HIV-1/2 和

HIV-2试验必须证明其对HIV-2感染的检出能力。目前，多数已获FDA批准的HIV-1/2试验加入了HIV-2的gp36抗原，能可靠检出HIV-2感染（表84-4，表84-5）。

（三）HIV的补充试验

HIV初筛免疫试验通过优化提高了敏感性，但常常牺牲了特异性。因此，HIV实验室诊断依靠联合应用一系列试验来提高准确性。在初筛试验中，无反应的标本通常判定为HIV阴性。如果初筛试验有反应，必须进行一个或多个补充试验。FDA批准了4个补充试验：HIV-1蛋白质印迹法、间接免疫荧光试验（indirect immunofluorescent assay，IFA）、HIV-1 RNA定性试验和HIV-1/HIV-2抗体区分试验。蛋白质印迹法和IFA均具有高度特异性，但由于依赖病毒裂解抗原和抗人IgG抗体结合物，两者检出HIV-1血清转换的时间比目前多数常规初筛试验晚，因此可能产生假阴性或不确定结果[118-119]。此外，由于交叉反应，蛋白质印迹法检测HIV-2感染者标本时，判读为HIV-1感染的可能性为46%～85%[120-121]。当血清或血浆标本未检出抗体时，可采用HIV RNA定性试验诊断HIV-1急性感染，对HIV抗体复检阳性的标本，HIV RNA定性试验还可作为一种补充试验。但是，有2%～5%蛋白质印迹法阳性的标本，无法检测到HIV-1 RNA。因此，当一份标本HIV-1/HIV-2抗体免疫试验复检阳性而HIV-1 RNA定性试验无反应时，必须经过补充试验确认是否存在HIV-1或HIV-2抗体[87,92]。2013年，FDA批准了两种HIV-1/HIV-2抗体区分试验（Multispot，Bio-Rad Laboratories），用于补充试验及区分HIV-1和HIV-2抗体。Multispot于2016年7月停产。2014年美国FDA批准的Geenius HIV 1/2确证试验（Bio-Rad Laboratories，Redmond，WA）是区分HIV-1和HIV-2抗体的可行替代品。Geenius区分试验只检测IgG，因此相比多数目前常规初筛免疫试验，其在血清转换期检出HIV抗体的时间较晚。

历史上，HIV-1蛋白质印迹法检测曾是HIV感染诊断的“金标准”[81]。蛋白质印迹通过分离和浓缩病毒组分使其特异性得到保证[122]。将HIV病毒裂解物加在电泳区的凝胶中，病毒组分混合物根据分子量大小分离，并形成特异性的“条带”，每一种病毒组分在分离后变得相对纯净，分别结合到膜上，再切割成条。检测实验室将反应条与患者的血清、血浆或干血斑块洗脱液孵育，再通过酶标抗人抗体进行检测。蛋白质印迹可以检测到以下HIV-1相关抗原的抗体：gp160、gp120、p66、p55、p51、gp41、p31、p24、p17和p15。一些制造商可能描述一些其他病毒条带，不同制造商产生的试剂中，一些抗原的分子量有微小差异。因为蛋白质印迹的HIV抗原来自培养细胞产生的病毒，非病毒的细胞蛋白可能出现在硝化纤维素条膜上，引起非特异性反应。HIV-1蛋白质印迹检测的结果解释主要依据CDC指南，阳性结果要求至少检测到以下3种抗原中的两种：p24、gp41或gp120/160[81]；无条带表示阴性结果；出现HIV相关条带但不满足阳性结果的标准，或者出现非病毒条带作为不确定结果。当HIV-1/HIV-2初筛免疫反应阳性，蛋白质印迹阴性或不确定时，应继续进行其他特异性检测HIV-2抗体的试验[123]。美国以外的蛋白质印迹法检测包含HIV-2抗原（如gp36或gp105），但是均未获得美国FDA批准。线性免疫试验与蛋白质印迹的原理相似，但在条膜上采用重组或合成抗原，代替了电泳胶中的病毒裂解物。这种方法的优势是反应中仅使用病毒抗原，消除了背景中细胞蛋白的非特异性交叉反应。制造商还控制了采用抗原的量和类型，并包括了HIV-2和O组抗原，以便于在同一个试验中确认这些感染[124]。INNO-LIA HIV Ⅰ/Ⅱ评分测试（Innogenetics，Ghent，Belgium）是一种在美国以外地区广泛使用的线性免疫试验。

Fluorognost HIV-1 IFA（Sanochemia）曾被用于初筛试验和补充试验，可以采用血清、血浆和干血斑洗脱液标本进行检测。将HIV感染及未感染的淋巴细胞固定在玻片上，首先与患者的血清共同孵育，然后加荧光素标记的抗人抗体[125]，再比较每一个患者血清标本与感染细胞及未感染细胞的荧光反应强度，如果感染淋巴细胞上的荧光强度超过非感染淋巴细胞（非特异性抗体结合），结果判定为阳性。这种方法技术要求较高，当患者有自身抗体或其他疾病时可能产生不确定结果。IFA除了作为一种非独立的补充试验，还可用于解决HIV-1蛋白质印迹不确定的问题。目前已有一种HIV-2特异性的IFA，但尚未获得美

国 FDA 批准。

APTIMA HIV-1 定性试验是美国 FDA 批准的检测 HIV-1 的试验。检测标本中的 HIV-1 RNA 与同 HIV-1 高度保守区同源的捕获核苷酸杂交，杂交的靶基因被磁性微球捕获，并在磁场作用下与血浆分离；靶基因通过转录依赖的核酸扩增实现扩增；再通过化学发光物标记的核酸探针特异性检测扩增子，用分光光度计测定化学发光信号，报告为相对光单位，分析的敏感性是 30 拷贝/ml HIV-1 RNA。此外，还有 HIV-1、HIV-2 RNA 定量及 DNA 核酸扩增试验（nucleic acid amplification tests，NAATs），但并未被美国 FDA 批准用于 HIV 感染诊断。

多点 HIV-1/HIV-2 快速检测（Bio-Rad Laboratories，Redmond，WA）是一种使用一次性试管区分 HIV-1 和 HIV-2 抗体的免疫渗滤快速 EIA。多点抗体区分试验对 HIV 感染的检测敏感性与蛋白质印迹法相当，但是不确定结果更少且能准确区分 HIV-2 抗体，包括那些 HIV-1 蛋白质印迹试验错误判为 HIV-1 的标本[118-119,126-127]。由于交叉反应，即使根据建议进行稀释后，在 HIV-1 和 HIV-2 反应点上仍有约 0.4%的样本呈现双阳性反应[119]。在美国，尽管多数双阳性样本属于 HIV-1 感染伴随 HIV-2 交叉反应[128]，但美国一项对 5 个双阳性标本的研究发现，在一个具有强 HIV-2 反应活性的标本中检测到了 HIV-2 RNA，提示 HIV-2 反应点呈强阳性的标本需要用 HIV-2 核酸试验进一步检测确认[126]。由于制造商停止生产，多点试验已不再使用。然而，Multispot 的制造商向市场推出了一种新的补充试验 Geenius HIV1/2 补充试验（(Bio-Rad Laboratories，Redmond，WA)，经临床试验证实该试验具有与 Multispot 相似的性能特征。Geenius HIV1/2 补充试验是一种免疫层析试验。Geenius HIV 1/2 补充试剂包含与胶体金颗粒结合的抗体结合蛋白 A，以及与膜固相载体结合的 HIV-1 和 HIV-2 抗原（gp36 HIV-2 包膜合成肽、gp140 HIV-2 包膜合成肽、p31 HIV-1 聚合酶肽、gp160 HIV-1 包膜重组蛋白、gp41 M 组和 O 组 HIV-1 包膜合成肽，p24 HIV-1 核心重组蛋白）。将样品加入缓冲孔中，当样本和缓冲液转移到测试条上之后，向缓冲孔中补充缓冲液，缓冲液使标本和试剂横向流动，促进抗体与抗原的结合。如样本中有 HIV 抗体，抗体被固定在测试区域的抗原捕获，胶体金结合蛋白 A 与捕获的抗体结合，形成粉红色/紫色的线。没有 HIV 抗体时，测试区域没有粉红色/紫色的线。样品继续通过薄膜迁移，在含有蛋白 A 的对照区（C）形成一条粉红色/紫色的线。对于美国 FDA 批准的试剂，检测结果由带有标准化算法的读取器读取，以最终确定 HIV-1 或 HIV-2 的反应活性。几项研究评估了目前推荐的实验室算法中 Geenius 检测的性能，数据表明，其检测 HIV-1 和 HIV-2 感染的性能与多点检测相当[129-131]。

九、抗病毒药物敏感性

耐药检测是抗逆转录病毒治疗的一个重要组成部分。对于未接受治疗的感染者，由于存在耐药株传播，根据耐药检测选择初治方案很重要，对于由于产生耐药性引起当前治疗方案失效的患者，耐药检测有助于选择其他抗逆转录病毒治疗方案（http://aidsinfo.nih.gov）。

HIV 耐药试验的临床效用已经在一系列的前瞻性随机临床试验中得到评估[50,132-133]。与根据抗病毒治疗史选择治疗方案的患者相比，根据耐药检测结果选择抗病毒治疗方案的患者病毒载量下降幅度更大，并且更加经济[134-135]。HIV 耐药检测有两种方法：基因型检测是检测患者标本中，病毒基因组中存在已知的能降低抗病毒药物敏感性的耐药突变；表型检测是在抗病毒药物存在条件下，检测病毒的复制能力。此外，进入抑制剂只针对利用 CCR5 辅助受体进入细胞的 HIV，HIV 嗜性试验已经成为病毒对进入抑制剂敏感性的重要评估方法。表 84-6 提供了一系列目前商品化的 HIV-1 耐药及嗜性检测的试剂盒。

表 84-6 HIV 耐药及嗜性检测

试验	类型	说明[a]
Viroseq HIV-1 测序系统(Abbott Molecular, Des Plaines, IL)	基因型耐药	检测蛋白酶抑制剂及逆转录酶抑制剂相关耐药突变
ViroSeq HIV-1 整合酶基因分型试剂盒(RUO)(Abbott Molecular, Des Plaines, IL)	基因型耐药	检测整合酶突变,但 FDA 未批准临床使用
GenoSure MG (Monogram Biosciences, South San Francisco, CA)	基因型耐药	检测蛋白酶抑制剂及逆转录酶抑制剂相关耐药突变
GenoSurePRIme (Monogram Biosciences, South San Francisco, CA)	基因型耐药	检测蛋白酶抑制剂、逆转录酶抑制剂及整合抑制剂相关耐药突变
Trofile(Monogram Biosciences, South San Francisco, CA)	细胞嗜性	确定病毒的细胞嗜性
HIV-1 基因型(Quest Diagnostics)	基因型耐药	检测蛋白酶抑制剂及逆转录酶抑制剂相关耐药突变
HIV-1 整合酶基因型(Quest Diagnostics)	基因型耐药	检测整合酶抑制剂相关耐药突变
HIV-1 辅助受体嗜性,深度测序(Quest Diagnostics)	基因型耐药和细胞嗜性	检测与 RTI 和 PIs 耐药性相关的突变,并决定能否使用 CCR5 拮抗剂治疗
PhenoSense HIV(逆转录酶和蛋白酶抑制剂)(Monogram Biosciences, South San Francisco, CA)	表型耐药	测定药物存在时病毒复制下降
PhenoSense 进入抑制剂敏感性测定(Monogram Biosciences, South San Francisco, CA)	表型耐药	测定药物存在时病毒复制下降
PhenoSense 整合酶(Monogram Biosciences, South San Francisco, CA)	表型耐药	测定药物存在时病毒复制下降
PhenoSense Entry (Monogram Biosciences, South San Francisco, CA)	表型耐药	评估对进入抑制剂恩夫韦肽的耐药性
PhenoSense GT (Monogram Biosciences, South San Francisco, CA)	基因型和表型耐药	检测蛋白酶抑制剂及逆转录酶抑制剂相关耐药突变及测定药物存在时病毒复制的下降
PhenoSense GT Plus 整合酶 (Monogram Biosciences, South San Francisco, CA)	基因型和表型耐药	检测蛋白酶抑制剂、逆转录酶抑制剂及整合抑制剂相关耐药突变,测定药物存在时病毒复制的下降

注:[a]RTIs. 逆转录酶抑制剂;PIs. 蛋白酶抑制剂

(一)基因型耐药检测

基因型检测的初始步骤包括从血浆中提取病毒 RNA 及 RT-PCR 扩增抗逆转录病毒药物靶点所在区域的病毒编码 RNA 序列。这些序列包括病毒 *pol* 基因区上的逆转录酶基因、蛋白酶基因和整合酶基因,以及 *env* 基因区中与进入和融合抑制剂相关的基因。扩增和检测病毒核苷酸序列是否存在已知的耐药突变,可以通过自动化测序技术来实现。通过病毒靶基因的核酸序列测序,并与野生型病毒核酸序列相比较,确定是否存在耐药突变。这一过程中,需要进行序列比对和编辑、与野生型序列比较,以及最后解释是否存在与特定抗逆转录病毒药物相关的耐药突变。目前,获得美国 FDA 批准包括测序试剂在内的 HIV 耐药检测试剂盒,以及用于序列比对和分析的商业化产品均已问世。TrugeneHIV-1 基因分型试剂盒(已经停产)、OpenGene DNA 测序系统(Siemens Healthcare Diagnostics)及 ViroSeq HIV-1 基因分型系统(Abbott Molecular)的检测方式类似[136],均检测逆转录酶和蛋白酶基因的突变,但不能检测整合酶或 CCR5 抑制剂相关的耐药突变。实验室自建的检测方法可以检测其他类型药物相关突变,如整合酶抑制剂和进入抑制剂。随着新的抗逆转录病毒药物不断增多,用于解释耐药突变的数据库需要定期更新。

美国 FDA 批准的依赖 Sanger 测序技术的基因型检测的局限性之一是只能检测到患者体内病毒优势突变株:即耐药变异株必须达到病毒群体的 25%～30%才能检测到[137]。尽管低水平耐药突变的临床重要性有待完全阐明,但已有证据表明,当标准基因型试验漏检劣势突变时,会导致随后的治疗失败[138]。由于标准基因型检测对低频率的耐药突变敏感性不足,人们正在努力通过多

种方法来提高敏感性，包括基于 PCR 的检测[139]和单基因组分析[140]。这些技术尚未获得美国 FDA 批准。然而，考虑到这些优势，下一代测序技术有望降低测序成本，并且这种方法已完成了临床应用评估[141]。目前，一些实验室自建的检测方法正在被一些专业参比实验室使用，如使用下一代测序技术的 Monogram Biosciences (https://www.monogrambio.com/hiv-tests/genotyping-vs-phenotyping)。

(二)表型耐药检测

表型试验是测定在多种不同浓度抗病毒药物存在条件下 HIV-1 的复制能力。能够抑制 50%或 90%病毒复制的药物浓度称为 50%或 90%药物抑制浓度(50% or 90% inhibitory concentration, IC_{50} 或 IC_{90})。将患者标本的 IC_{50} 或 IC_{90} 与野生型病毒对照相比较，以相对差异报告结果。早期的表型耐药检测因需分离和培养患者标本中的 HIV，工作量很大。目前的商品化的方法是从患者血浆中扩增的 HIV-1 RNA，并运用 DNA 重组技术。虽然这些表型试验都是自动化的，但仍费力且技术复杂，且尚无商品化试剂盒，仅在 2 个商业化的实验室开展：Quest 和 Monogram Biosciences (South San Francisco, CA)。首先从患者血浆中提取 HIV-1 RNA，逆转录和 PCR 扩增病毒基因，然后将扩增基因插入到含 HIV 病毒骨架的载体中，或者用于制备含有患者病毒序列的假病毒。通过报告基因的表达监测这些病毒在不同药物浓度下的复制，并与 HIV 参考株的复制进行比较，在培养中使用重组病毒来检测耐药性。与基因型检测类似，表型试验只能检测占病毒群体 25%以上的变异株。

一般而言，由于基因型检测成本低、耗时短，多用于用于新近诊断的个体，以指导最佳治疗。在治疗失败的情况下，基因型和表型相结合的检测常被用来指导最佳治疗。

(三)嗜性检测

CCR5 抑制剂马拉韦罗需要检测细胞嗜性，因为这种药物只对以 CCR5 为辅助受体的病毒有效，对 CXCR4 嗜性病毒或者双嗜性/混合嗜性病毒无效，因此在使用马拉韦罗或其他 CCR5 抑制剂之前，必须进行这种嗜性检测，以确定病毒是否为 CCR5 嗜性。嗜性检测与耐药检测类似，有基因型和表型两种常用方法，均有商品化嗜性检测试剂。Trofile 试验(Monogram Biosciences)采用表型检测方法，Quest Diagnostics 通过深度测序(Quest Diagnostics)检测 HIV-1 辅助受体嗜性，为基因型检测方法。Trofile 试验通过扩增患者体内病毒 *env* 基因来构建假病毒，以假病毒分别感染表达 CXCR4 或 CCR5 受体的 CD41/U87 细胞，根据病毒感染细胞的类型来判断其为 CXCR4 嗜性、CCR5 嗜性或者双嗜性/混合嗜性[141]。只携带 CCR5 嗜性病毒的感染者是 CCR5 抑制剂的适用人群。有研究报道突变可使病毒获得利用 CXCR4 辅助受体的能力，或者使膜蛋白结构发生改变阻止药物发挥作用，引起马拉韦罗耐药[142-143]。

十、结果的评价、解释和报告

(一)免疫检测的应用与解释

目前常规免疫试验的敏感性和特异性非常高，但在 HIV 感染早期，抗原或抗体出现之前可能出现假阴性结果[101-102]。有报道发现，暴露前或暴露后接受预防性抗逆转录病毒治疗的人群血清转换延迟[144-145]。虽然假阳性结果很少见，但也有报道发现在免疫接种后可短暂出现假阳性，或接受 HIV 疫苗试验的受试者也可出现假阳性[146-148]。任何应用于低流行的人群的筛查试验，阳性预测值都可能偏低。对于确定的感染者，目前美国 FDA 批准的快速试验检测，敏感性与常规免疫试验相当，但在早期感染阶段，前者假阴性结果更多[149]。与全血或血清标本相比，采用唾液标本检测时，假阴性和假阳性结果都更常见[101,106]。

当初筛免疫试验呈阳性反应时，用一种补充试验来确认所有标本是否存在 HIV 感染还不够充分。对于 HIV 感染早期的标本，Western blot 和 IFA 的敏感性均低于第三代或第四代免疫试验，可能出现假阴性或不确定的结果[86,150]，而 2%～5%抗体阳性的感染者中也可能检测不到 HIV-1 RNA[92,151]。因此，2014 年，美国 CDC 和公共卫生实验室协会发布了最新的 HIV 实验室检测指南(图 84-3)。这些指南及最近的技术更新可以在 https://stacks.cdc.gov/view/cdc/23447 上找到。2014 年发布的规则最大限度提高了检测 HIV-1 急性感染和正确分类 HIV-2 感染者的能

力。首先进行 HIV-1/2 抗原/抗体联合免疫试验，如果有反应性，接下来进行 HIV-1/HIV-2 抗体区分试验，通过免疫初筛试验及抗体区分试验确认 HIV-1 或 HIV-2 抗体的存在，不需要其他进一步试验。抗体区分试验无反应性或结果不确定的标本进行 HIV-1 核酸检测。若第四代免疫试验结果阳性、抗体区分试验阴性、HIV-1 核酸检测阳性，提示存在 HIV-1 急性感染，HIV-1 核酸检测阴性提示初筛免疫试验假阳性。如果初筛试验采用第三代试剂，应以相同顺序进行补充试验。HIV 检测报告应该具体说明所有采用的试验、每个试验的结果及结果的解释。报告所使用的语言可以从纽约州卫生局、临床和实验室标准研究所和公共卫生实验室协会获得[152-153]。

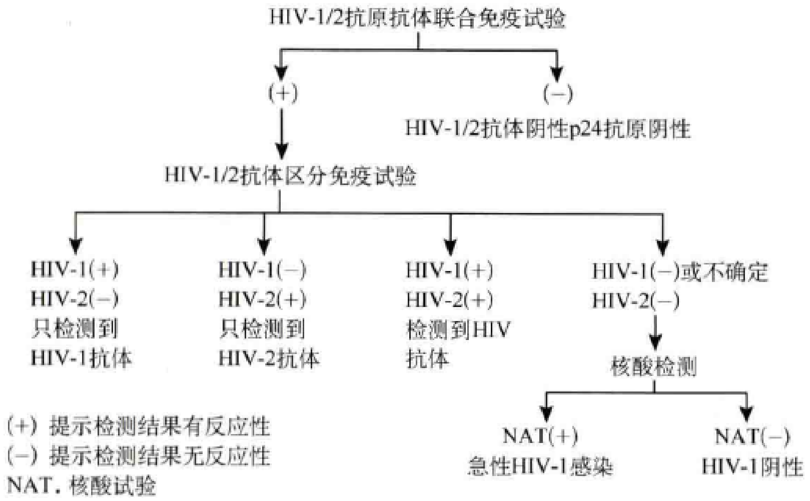


图 84-3 HIV 诊断检测流程

根据检测规则提示，对检测结果阳性患者需要提供 HIV 医疗服务及其他实验室检测的初步评估(如 HIV-1 病毒载量、$CD4^+$ 淋巴细胞计数、抗逆转录病毒耐药性检测)，进行 HIV 疾病分期及为选择初始抗逆转录病毒治疗方案提供辅助[154]。尚无任何诊断试验或规则能在所有 HIV 感染病例中完全正确。在临床评估中出现不一致或有冲突的检测结果，或与临床发现不符的结果，需采用不同方法对随访标本进行进一步检测。

在其他机构快速检测阳性的标本应与其他标本采用相同的实验室检测流程，本建议的依据是没有在其他机构中进行快速检测结果的正式记录的情况。更新的 CDC 实验室检测规则中使用的试验不适用于唾液、干血斑或尿标本，对于这些替代标本，应采用获准使用上述类型标本的特异性免疫试验进行检测。

(二)HIV RNA 及 DNA 定性试验的应用及结果解释

在成人中，HIV-1 RNA 检测主要用于诊断急性感染，既作为诊断规则的一部分，又可用于免疫试验阴性标本的集合试验(pooled testing)检测[155,156]。婴儿诊断也需要核酸检测，因为来自 HIV 感染母亲的抗体可以在未感染婴儿体内存在 18 个月，血清学试验不适用于婴儿 HIV 感染诊断。HIV-1 RNA 和 DNA 检测都可以用于新生儿 HIV-1 感染的诊断。DNA 检测一般作为确定暴露婴儿 HIV-1 感染状态的优选方法，但最新研究表明，HIV-1 RNA 检测对于刚出生及 4 周龄内的婴儿更敏感[157]。DNA 或 RNA 检测也可以采用全血或干血斑标本，但标本必须采自刚出生的新生儿，而不是脐带血，脐带血标本假阳性率很高[158]。目前建议 HIV 暴露的新生儿在出生后 14 天内、1～2 个月及 4～6 个月进行检测，也有专家提议为提高疗效和获得新生儿功能性治愈相关的最新数据，在婴儿出生时即进行检测[159-161]。无论何年龄，两次独立采集标本的 RNA 或 DNA 呈阳性反应即可诊断新生儿 HIV-1 感染。定性检验的特征各不相同，而待检人群也可能影响最佳试验的选择，如对非 B 亚型、流行重组型及 O 组病毒，Aptima 试验可能比某些 HIV-1DNA 试验更敏感。检测前病毒 DNA 试验的优点之一是，即使对正在接受有效抗逆转录病毒治疗的个体及能够自然控制病毒复制的个体，

一般也能保持阳性。然而，目前，前病毒 DNA 试验尚未获得美国 FDA 批准。

(三)病毒载量分析的应用及解释

HIV-1 病毒载量检测已经获得很好的临床应用，因其可预测进展到 AIDS 的时间及监测治疗反应，广泛用于监测抗逆转录病毒治疗过程中血浆病毒血症的变化。病毒载量的下降幅度依赖于抗逆转录病毒治疗的有效性。最佳的治疗目标是抑制病毒载量到检测限以下。在开始治疗前，应获得患者基线 HIV-1 RNA 病毒载量，在改变治疗方案前应重复检测。在开始治疗后，患者应在 2～8 周内检测病毒载量，评估药物疗效，以后每 3～4 个月检测 1 次，来评估疗效的持久性。以病毒载量指导抗逆转录病毒治疗的新版指南可在 http://aidsinfo.nih.gov/guidelines 获得。

据估计在临床症状稳定的患者中，HIV-1 RNA 水平的生物学变异约为 0.3$\log_{10}$[162]。商品化的病毒载量试剂的变异范围为（0.1～0.3）$\log_{10}$，重复性取决于试剂的动态范围。对于接受抗病毒治疗的患者，HIV RNA 水平在 48～200 拷贝/ml 的临床意义尚存争论，HIV RNA 持续超过 200 拷贝/ml，常有证据提示病毒进化和耐药突变累积[163]；血浆 HIV RNA 水平持续处于 200～1000 拷贝/ml，提示抗病毒治疗失败；病毒血症“反跳”（如在病毒被抑制后，再次检出 HIV RNA，随后又回落到检测不出的水平）通常与后来的抗病毒治疗失败无关[164]。

许多研究对美国 FDA 批准的常规病毒载量检测试剂的性能进行比较，发现这些试剂在检测抗逆转录病毒治疗后血浆中 RNA 水平净变化方面高度相关[165-167]。对同一标本，早期的病毒载量试剂检测结果间存在较大的差异，但新一代试验方法已经标准化，不同试剂测得数值的差异正在缩小。尽管不同病毒载量试剂的整体一致性已经有所提高，在监测患者病毒载量值时，最好始终采用相同的方法。特别是在免疫状态稳定、病毒载量很低并接近检测下限的患者中，不同平台的检测结果存在一些变异性[167]。

当出现模棱两可的血清学结果或需要对 HIV-1 急性感染期及儿童感染进行辅助诊断时，有时需要进行 HIV-1 RNA 载量检测。可以根据医生的医嘱进行上述目的病毒载量检测，但该检测并非美国 FDA 批准的诊断 HIV-1 感染的方法，在常规用于上述目的之前，需首先在实验室进行验证。在样本处理过程中的污染、扩增产物遗留或选择不正确的阈值定义阳性反应，都可能导致假阳性结果。

(四)耐药检测的应用和解释

用于成人 HIV-1 耐药检测的临床指南会定期发布和更新[168]。一般来讲，指南建议对没有立即开始抗逆转录病毒治疗的患者、治疗失败的患者、孕妇和急性感染患者进行耐药检测。与表型试验相比，基因型试验应用更广泛，技术上更容易操作、更快捷，费用更低。在一些个体中，表型出现变化之前可能会先检测到基因型耐药突变，所以基因型检测和表型检测结果并非总是一致的。基因型检测的局限性之一是产生数据的复杂性。面对快速更新的抗病毒药物和新的耐药信息，更新数据库中与特定药物组合的相关突变数据仍具有挑战性。美国国际艾滋病协会网站（http://www.iasusa.org）和斯坦福大学网站（http://hivdb.stanford.edu/）提供各类药物耐药突变的更新列表。

HIV-1 基因型检测结果的解释非常复杂：需要确定每一种药物相关突变、耐药突变位点间的相互作用及交叉耐药的遗传学知识。大多数系统遵循一种特定的规则，专家组根据特定药物耐药的突变类型或突变组合建立解释规则。根据检测到的突变，报告会描述对于不同类药物中的每种药物，患者标本中的病毒无耐药、耐药或可能耐药，或因证据不足，无法将该病毒归入 3 种类别之一。这些规则系统给临床医生提供了易于解释的信息，但是要求数据库经常更新。生产商的数据库更新可能落后于发表的文献，所以临床医生可能发现需要一种在线数据库来获得最新的信息。因此，实验室给临床医生同时提供特定突变位点及耐药解释，这对于临床医生是很有帮助的，这样可使医生能够更容易地使用在线数据库。

表型试验给临床医生提供一种更加熟悉的结果报告方式，结果以相对于野生型病毒 IC_{50} 变化的形式提供。此外，由于表型耐药直接检测药物敏感性，对报告结果不需要额外的专家解释。表型检测的问题之一是患者联合使用药物，但并非联合检测药物敏感性，因此无法检测到协同效应。

不同药物的 IC_{50} 值显著变化的临界值(cutoff 值)差异很大。最初,人们以重复性试验建立生物学临界值,经过一段时间以后,多数药物已经建立了与结果有关的临床临界值。

只有当待检血浆标本包含的 HIV-1 RNA 为 500~1000 拷贝/ml 时,才能获得表型和基因型试验结果。根据使用的提取方法,当标本的病毒载量略低时也可能获得结果。高速离心可富集血浆中的病毒,可能使病毒载量低于 500 拷贝/ml 的标本也能够获得序列,但是这个过程也可能使抑制剂和干扰物浓缩。由于基因型耐药试验所需的劳力和费用,实验室应建立能够获得可靠测序结果的更低病毒载量检测限。此外,只有在耐药株突变达到病毒准种的 20%~30%时,基因型和表型试验才能检测到突变。基因型和表型耐药试验都可能发生交叉污染,因为两者都需要依赖 RT-PCR 来扩增 HIV-1 基因序列。两种方法在患者诊疗过程中均有临床价值并广泛应用于临床实践。然而,因基因型检测具有更广泛的实用性、更快的周转时间、更低的费用,大多数临床医生采用基因型检测结果初步评估耐药性。另一方面,表型试验可以帮助确定新发现的耐药突变的重要性,以及明确复杂突变相互作用的效果,对于确定补救治疗方案可能很有帮助。抗逆转录病毒疗法的不断提高,同时需要药物耐药性检测技术不断提高。虽然尚无美国 FDA 明确批准的基于下一代测序技术的检测方法,但是利用这一技术进行了大量的 HIV 耐药性监测并取得了很大进展。这种技术的潜在优势是降低成本,并且能够检测到含量非常低的耐药性病毒[169-171]。例如,下一代测序可以检测 1%~5%的突变,或者是超过自然发生突变率的耐药突变[172]。

参考文献请扫二维码查阅

第85章 人类嗜T淋巴细胞病毒

WILLIAM M. SWITZER, WALID HENEINE, S. MICHELE OWEN

（韩晓旭 译；徐春晖、曹彬 审校）

一、分类

人类嗜T淋巴细胞病毒1型和2型（human T-cell lymphotropic virus types 1 and 2，HTLV-1和HTLV-2）属于逆转录病毒科（*Retroviridae* family）δ逆转录病毒属（*Deltaretrovirus* genus）[1]。HTLV可能源于猴嗜T淋巴细胞病毒（simian T-cell lymphotropic viruses，STLVs）的跨物种传播。因此，这组病毒统称为灵长类嗜T淋巴细胞病毒（primate T-lymphotropic viruses，PTLVs）[2-3]。虽然HTLV-1与STLV-1系统进化关系相近提示HTLV-1起源自猴，但HTLV-2和STLV-2关系较远，因此不能确定HTLV-2也起源自猴。近期，人们从喀麦隆的狩猎者中鉴定出两株新HTLV病毒，称为HTLV-3和HTLV-4[2,4-6]。HTLV-3可能来源于感染了高度相关STLV-3病毒的猴[2,4-5]。HTLV-4与其他所有HTLVs的同源性均不高，人们最近发现其存在于喀麦隆大猩猩中[7-8]。HTLVs病毒和STLVs病毒与慢病毒属（*Lentivirus* genus）不同，后者包括人类免疫缺陷病毒1型和2型（HIV-1和HIV-2）及猴免疫缺陷病毒（simian immunodeficiency viruses，SIVs）[1]。十多年前，根据国际病毒分类委员会的指南，用阿拉伯数字代替罗马数字对HTLV进行分型[1]。

二、病毒学特征

HTLV-1和HTLV-2是直径为80～100 nm的包膜病毒，其中央是高电子密度的核心，包膜表面有少量刺突。目前，虽尚未对HTLV-3和HTLV-4进行电子图像研究，它们可能具有与HTLV-1和HTLV-2相似的形态结构。病毒核心包含两条单股正链RNA。HTLV一旦感染细胞，其RNA在逆转录酶的作用下转变为DNA，并整合到宿主基因组中。

HTLVs是一种复杂的逆转录病毒，除了具有在所有经典逆转录病毒中均可见到的结构基因和酶编码基因*gag*、*pol*和*env*外，还具有调节基因。HTLV-1、HTLV-2、HTLV-3和HTLV-4均具有相似的基因组构成：型特异性抗原（*gag*）、蛋白酶/聚合酶（*pro*/*pol*）、包膜（*env*）及附属基因区域（*pX*），以及两侧长末端重复序列（long terminal repeats，LTRs）（图85-1）。每种型别的HTLV高度分化，仅有60%的核苷酸同源[8-10]。*gag*基因编码结构蛋白、基质蛋白（p19）、衣壳蛋白（p24）和核衣壳蛋白（p15）（图85-2）。*pro*和*pol*基因分别编码蛋白酶和逆转录酶。*env*基因分别编码跨膜（transmembrane，TM）糖蛋白gp21和外膜或表面（SU）糖蛋白gp46。

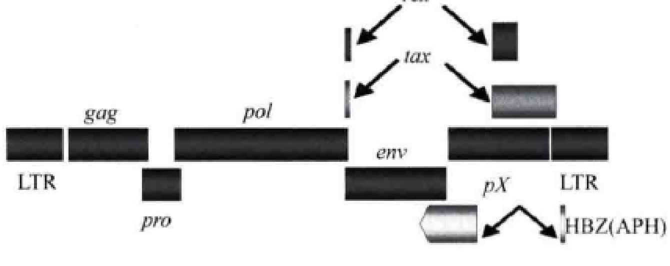


图85-1 HTLV的基因组结构 LTR，长末端重复序列

注：*gag*. 型特异性抗原；*env*. 包膜；*pol*. 聚合酶（包括逆转录酶和整合酶）；*pro*. 蛋白酶；*rex*. 病毒表达的调节因子；*tax*. 转录活化因子；HBZ. HTLV-1碱性亮氨酸拉链蛋白，也称HTLV反义蛋白APH。其他辅助基因（未列出）位于HTLV *env*基因和3′LTR之间的*pX*区之间。Gag和Env蛋白免疫原性最强，对应抗体一般可通过血清学试验检测（EIA和蛋白质印迹法）。PCR试验一般用于检测LTR区和*gag*、*pol*、*env*和（或）*tax*基因

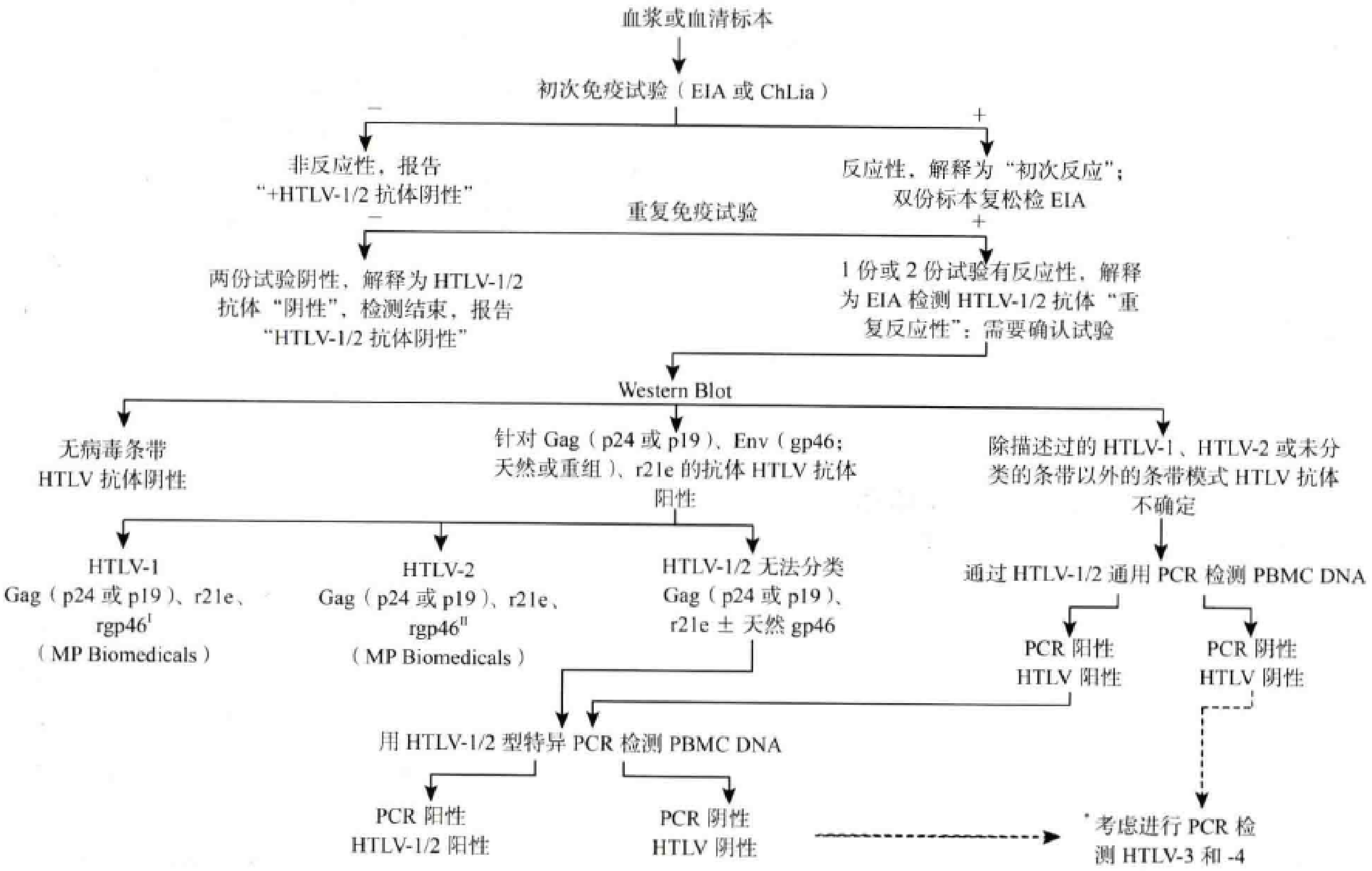


图 85-2 HTLV-1 和 HTLV-2 感染的血清学试验流程。如果初次筛查试验(EIA 或 ChLIA)为阳性,则对同一样本重复试验。如果重复检测 1 次或 2 次结果为阳性,则样本定为重复检测阳性,确诊需做补充试验。标注的是制造商使用的 WB 判定标准,而美国公共卫生服务工作组并未采用。一些情况下,在进一步的随访中使用 HTLV 通用型和(或)型特异 PCR 检测。如患者与喀麦隆或非洲中西部有关,则考虑进行 HTLV-3 和 HTLV-4 特异的 PCR。r21e. 重组 p21 包膜(Env)蛋白;rgp46^{I} 和 rgp46^{II}. HTLV-1 或 HTLV-2 特异 Env 重组糖蛋白;Gag. 型特异性抗原;PBMC. 外周血单个核细胞

HTLVs 利用可变剪切和内部起始密码子,通过位于 *env* 和 3′LTR 之间的病毒基因组 *pX* 区的编码基因,可产生至少由 4 个可读框(open reading frames, ORFs)编码的多种调节和附属蛋白[11-12]。*pX* 区编码剪切调节蛋白 Tax 和 Rex 及几个额外的 ORF,其中一些认为与病毒的复制和转运有关(图 85-1)。与其他逆转录病毒不同的是,HTLV 还在反义链上编码一种蛋白质,称为 HTLV 反义蛋白,它是一种 Tax 介导的病毒转录的抑制因子(图 85-1)[13]。HTLV 反义蛋白首次发现于 HTLV-1 中,它含有一个碱性亮氨酸拉链(basic leucine zipper, bZIP)基序,最初命名为 HBZ(HTLV-1 bZIP protein)[14-15]。在一些 HTLV-1 感染者中,HBZ 认为可以控制细胞的复制,促进白血病相关的 T 淋巴细胞增殖[13,16-17]。目前在所有灵长类嗜 T 淋巴细胞病毒中均发现了反义蛋白,提示其在维持进化和生物学功能上发挥重要作用[8,10,13]。

HTLV-1 和 HTLV-2 利用由 3 种不同分子组成的受体复合物进入细胞,包括 1 型葡萄糖转运蛋白(glucose transporter type 1,GLUT-1)、VEGF-165 受体神经菌毛素 1(VEGF-165 receptor Neuropilin 1,NPR-1)和肝素硫酸乙酰蛋白多糖(heparin sulfate proteoglycans, HSPG)[18-23]。HTLV-1 优先感染 $CD4^+$ T 细胞,而 $CD8^+$ T 细胞是 HTLV-2 的主要靶细胞[18]。体外实验研究显示,HTLV-3 能够感染 $CD4^+$ T 细胞和 $CD8^+$ T 细胞,利用 GLUT-1 进入靶细,但不需要 HSPG 或 NRP-1,表明 HTLV-3 可能利用其他受体分子复合物[19]。至今尚无 HTLV-4 细胞受体的相关报道。

三、流行病学和传播

近年来,有学者对自从 1981 年 HTLV 发现

以来的1100篇流行病学文献数据进行荟萃分析，结果显示，全世界估计有500万～1000万人感染了HTLV-1，地方性流行区域包括日本西南部、加勒比海及周围岛屿、撒哈拉以南非洲大部分地区和美国中南部，美拉尼西亚的少数地区、中东（伊朗北部）和罗马尼亚[24]。加勒比海群岛成人的血清阳性率为2%～17%，而日本南部人群血清阳性率最高（1.7%～17.4%）[24-25]。虽然目前尚无对世界范围内HTLV-2的感染数量进行类似的荟萃分析，但在遍布美洲的印第安部落和中非几个俾格米人部落中，HTLV-2呈地方性流行，俾格米部落的血清阳性率约为3%，南美印第安部落为1.0%～5.8%，中美印第安部落为8%～10%，北美印第安部落为2%～13%[26-28]。HTLV-3和HTLV-4仅在喀麦隆一些灵长类动物狩猎者中被发现，而且似乎没有在当地或全球传播，尽管筛查仅限于某些非洲以外（non-African）的种群[2,4-5,29-31]。在形成局部流行的地区，HTLV-1和HTLV-2血清阳性率随年龄而增加，特别是女性[24-25,32]。在美国和欧洲，低危人群中HTLV-1和HTLV-2的血清阳性率均低于1%[33-34]，而在静脉吸毒者（intravenous drugusers，IDUs）等高危人群，HTLV-2感染多于HTLV-1感染，血清阳性率达到0.4%～20.0%[24-25]。非裔美籍IDU人群，特别是在新奥尔良市，HTLV-2感染的风险增加[25]。越南南部的IDU人群，HTLV-2感染率很高（>60%），这可能是越南战争时期由美国军人传入并播散造成的[35]。

HTLV-1和HTLV-2感染途径包括性传播（主要是男性传染给女性）、垂直传播（母婴传播，多是由于哺乳期延长）、肠外传播（静脉吸毒和输血）[24-25,32]。在非地方性流行的人群中，静脉吸毒、与IDUs发生性行为是HTLV-2传播最重要的危险因素[24-25,32]。横断面研究和前瞻性研究均支持了性传播理论，且在HTLV-2流行地区，配偶间的血清阳性反应呈现高度一致[24-25,32]。一项研究表明，传播方式可能影响病毒的进化率，如，HTLV-2毒株在IDU人群中的进化率比母婴传播快150～350倍[36]。IDUs人群之间，每年可以发生多次传播，病毒传播率的提高可能导致HTLV-2进化率提高，而在垂直传播中，对于一个既定的病毒谱系（viral lineage），每14～30年仅发生一次传播，导致进化更慢[36]。IDU人群中传播率和进化率提高，可能增加产生更强毒力的HTLV-2毒株的风险。

过去的20年，日本、澳洲、美国、加拿大和一些加勒比海及欧洲国家为了降低输血相关的HTLV-1和HTLV-2传播风险，已经对无偿献血者采用高效筛查策略[25,32-34]。例如，1991－1996年，美国献血者HTLV血清阳转的发生率约为1.59/100 000人年[33]，筛查后输血传播HTLV的残余风险估计为1/641 000[33]。从1998－2001年，在美国红十字会（American Red Cross，ARC）的重复献血者中，新感染的发生率估计为0.239/100 000人年，感染窗口期采血估计危险度为1∶2 993 000[37]。随后，ARC发现，2007－2008年，重复献血者中输血传播HTLV的发生率和残余危险性分别降低到0.21/100 000人年和1∶3 394 086，进一步证明普及血液筛查是成功的[38]。

许多分子流行病学研究表明，HTLV前病毒（provirus）在遗传上是非常稳定的，这使得对这些病毒的系统发育和分子年代测定具有很强的分辨率[8,10,39-41]。HTLV-1进化速率不同于HIV-1，这是由于HTLV需通过其感染细胞进行克隆性增值，而HIV-1则是通过病毒活跃复制[42-43]。尽管HTLV整个基因组高度保守，但LTR、*tax*、*pol*和gp21 *env*基因的核苷酸差异能用于区分HTLV-1和HTLV-2，最近也用于区分HTLV-3和HTLV-4[29,44-47]。HTLV的多样性和不断出现的变异株对HTLV血清学试验提出挑战，因此了解系统进化关系尤为重要。在不同地区，通过几次独立的猴与人类宿主间传播，至少有7种主要的地区性HTLV-1亚型从STLV-1进化而来[2-4]：A亚型（全球性）、B亚型（中非）、C亚型（澳洲原住民）、D亚型（中非，主要是俾格米部落）、E亚型（刚果的一个Efe俾格米部落）、F亚型（刚果共和国）、G亚型（非洲中西部的灵长类动物猎人）[2-3,24,48]。HTLV-2有3个亚型，命名为2a、2b和2d[26-27]，它们起源于单一灵长类动物，这是因为STLV-2仅发现于倭黑猩猩[3,49]。2a亚型分布于世界的IDU人群，而2b亚型主要见于美洲印第安人和喀麦隆的部分俾格米人，2d亚型仅在刚果共和国的一个俾格米人身上发现。早期研究认为2c亚型出现在巴西的一个美洲印第安部落，然而全基因组的亚型分析证明，其实际为2a的变异株[50]。近期发生在喀麦隆，人接触非人灵长类后

发生的跨物种间传播是 HTLV-3 最可能的起源[2,4-5,28,51]。系统发育分析明确了 HTLV-3 起源于至少 4 种高度分化的 STLV-3 亚型，因此，HTLV-3 也有 4 种亚型[2,4-5,28,51-52]。A 亚型和 C 亚型包括来自非洲东部一只狒狒的 STLV-3 和喀麦隆白鼻长尾猴（Cercopithecus nictitans）的 STLV-3，但尚无人类感染这 2 个亚型病毒的报道[53-55]。B 亚型包括非洲中西部的 STLV-3 和 HTLV-3，而 D 亚型出现在喀麦隆的猴及人类中[2-5,28,48,51,55]。最近第五例人类感染 HTLV-3 的病例报道，其感染的为 D 亚型，患者为喀麦隆的一名农民，他同时也感染了 HIV-1[56]。HTLV-4 最初是在一个喀麦隆的狩猎者体内检出[2]，但最近在加蓬又发现了另外 2 名感染的狩猎者[57]。上述研究表明广泛的 STLV 正不断发生跨物种传播，这并非罕见的历史事件。目前尚不清楚 HTLV-3 和 HTLV-4 是否会引起人类致死性感染，或是否具有局部或全球性扩散的潜能。最近，人们从一只猕猴身上发现新毒株 STLV-5，最初被归类为 STLV-1，但详细的系统发育分析提示其与 STLV-1 差异较大[58-59]，目前尚未发现与 STLV-5 对应的人相关病毒。HTLV 的遗传异质性为地理聚类、祖先迁移和病毒传播的研究提供了有价值的信息[3,8,10,24-39,40,47,60-61]。

四、临床意义

HTLV 与 2 类主要疾病相关：成人 T 淋巴细胞白血病/淋巴瘤（adult T-cell leukemia/lymphoma，ATLL）和 HTLV-1 相关脊髓病/热带痉挛性瘫痪症（HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis，HAM/TSP）。感染者中，疾病发生率低于 5%[24-25,32]。ATLL 分为 4 型：急性型、慢性型、冒烟型（smoldering）和 T 细胞非霍奇金淋巴瘤。急性型约占全部 ATLL 的 75%，可以快速致人死亡。ATLL 以 $CD4^+$，$CD25^+$ T 淋巴细胞的快速增殖为特征，其生物学诊断依据包括：HTLV-1 血清学阳性、出现形态学独特的核碎裂 $CD3^+/4^+/25^+$ 淋巴细胞（花细胞）、肿瘤细胞中 HTLV-1 前病毒克隆性整合，可通过 Southern Blotting、反向 PCR 或超深度测序分析等新技术检测[17,62-63]。Tax 和 HBZ 均认为参与了 ATLL 疾病进展[13,17,64]。

HAM/TSP 表现为腿部肌肉无力、反射亢进、阵挛、足底伸肌反射、感觉功能障碍、多种泌尿系症状、阳痿及下腰痛等[24-25,32,64-65]。下肢痉挛是 HAM/TSP 致残的主要原因，患者经常需要依靠轮椅。主要生物学诊断包括在血清和脑脊液（cerebrospinal fluid，CSF）中出现高滴度 HTLV 特异性抗体。研究表明与有其他神经障碍的 HTLV-1 感染者相比，HAM/TSP 患者 CSF 中 HTLV-1 感染的细胞数量是外周血中的 2 倍，并且 PCR 检测这些部位前病毒的载量具有诊断价值[64]。据估计，HTLV-1 感染者进展为 HAM/TSP 的终身危险度为 0.2%～4.0%，但存在地区差异，且更易发生在 40 岁以上人群[24-25]。其他与 HTLV 相关的少见炎症性疾病包括感染性皮炎、葡萄膜炎、多发性肌炎、甲状腺炎、肺炎及与 HTLV 相关的关节病[24-25,32,64-65]。也有病例报告显示 HTLV-1 感染者发生机会性感染的可能性会增加，如巨细胞病毒（cytomegalovirus，CMV）、耶氏肺孢子菌、带状疱疹、隐球菌和鸟分枝杆菌[25]。有研究显示，与无症状感染者相比，尽管高前病毒载量的患者也能维持数 10 年无症状，ATLL 和 HAM/TSP 患者病毒载量升高仍是疾病进展最好的预测指标之一[24-25,32,64]。

目前尚未确定 HTLV-2 与恶性肿瘤有关，但极少数会发生类似 HAM/TSP 的神经疾病，疾病进程更慢，症状较轻[25,66]。对 HTLV-2 感染者发生疾病进展的终身危险度估计尚不清楚，但似乎低于 HTLV-1 感染者[25-26]。虽然，多数 HTLV-2 感染者（>95%）是无症状的，但近期研究表明其患感染性疾病[如支气管炎、肺炎、肺结核、肾和（或）膀胱感染]的发病率升高[25,66]。近期美国一项 HTLV-2 感染者队列研究也发现 HTLV-2 感染者和全因癌症及癌症死亡率均具有较高的相关性，这提示仍需进一步研究 HTLV-2 的潜在致病性[67]。

HTLV 与 HIV 共感染可发生在高危人群中，如来自 HTLV 流行地区的人和 IDU。迄今，一些 HIV-1 和 HTLV 共感染的评估研究提示共感染会增加 HTLV-1 相关临床结局（白血病和神经系统疾病）的发生频率，尤其是 $CD4^+$ T 细胞数较高者。相反，一些 HIV-1/HTLV-2 共感染患者会延迟进展到艾滋病期[68-70]。而且，包括高效抗逆转录病毒治疗在内的 HIV 治疗并不能影响 HTLV-

2/HIV-1 共感染者的 HTLV-2 前病毒数量,但能够控制 AIDS 的疾病进展[69,71]。少数研究表明,HIV-1 共感染可能增加 HTLV-1 感染者的发病率。一项近期研究发现,HTLV-1 和 HTLV-2 的 Tax 蛋白可抑制 HIV-1 体外复制,表明 HTLV 在 HIV-1 感染中起到保护作用[68]。然而,共感染是否影响 HTLV 感染者的死亡率尚有待研究。受限于在健康人群中感染人数极少,HTLV-3 和 HTLV-4 的潜在致病能力尚不清楚[2,4-5,28]。另外,对欧洲门诊患者和美国部分癌症患者的有限研究中尚未发现 HTLV-3 和 HTLV-4 感染的证据[29-31,72]。

HTLV 相关疾病的治疗选择有限[17,25]。尚未证实化学疗法能有效控制进行性 ATLL[73-75]。虽然齐多夫定(zidovudine,AZT)和 α 干扰素(Alpha interferon,IFN-α)能产生部分效果并改善 ATLL 预后,但仍急需其他有效的替代治疗方案[73-75]。新药如三氧化二砷、蛋白酶抑制剂、类维生素 A 和血管生成抑制剂,以及细胞免疫治疗尚在研究中[73-75]。在青年人群中,异基因造血干细胞移植提高了侵袭性 ATLL 的存活率[76]。抗病毒治疗,如拉米夫定和大剂量 IFN-α、IFN-β 已经在 HAM/TSP 患者中进行评估,评估发现上述药物能够降低前病毒载量、改变 T 细胞表型、改变抗 tax 的细胞毒性 T 细胞频率[77]。然而,免疫调节治疗的进一步随访效果不理想,联合抗逆转录病毒治疗(齐多夫定和拉米夫定)效果不理想,因为其只能部分或暂时降低前病毒载量[78-79]。一项采用齐多夫定和丙戊酸钠治疗 STLV-1 感染的狒狒的研究显示,病毒载量显著下降,但目前尚无 HTLV-1 感染者使用这 2 种制剂的临床试验的相关报道[80]。对症治疗和靶向治疗仍然是 HAM/TSP 治疗的基础[77-78]。最近的一项研究发现整合酶抑制剂拉替拉韦(raltegravir)在体外具有很强的抗 HTLV-1 活性[81],但拉替拉韦的临床治疗效果尚不十分清楚。然而,一项小型研究中,2 例 HAM/TSP 患者和 3 例无症状 HTLV-1 感染者接受拉替拉韦治疗 12 个月后,前病毒载量并未持久下降[82]。葡萄膜炎患者局部和系统使用糖皮质激素可改善视力,并且抗病毒药物对感染性皮炎治疗效果良好[25]。

尽管在各种 HTLV 疫苗的动物模型研究中,人们已经用多肽诱导出中和抗体和强细胞毒性 T 淋巴细胞应答反应,并且人工合成抑制性多肽和中和抗体能够阻断包膜介导的病毒穿入,但是上述疫苗尚未用于临床试验[25]。近期,一种由重组表面蛋白构成的亚单位疫苗已经在鼠模型上成功激活了细胞介导的细胞毒应答反应并能中和病毒的感染性[83]。尽管这些研究有望于开发出潜在的 HTLV 疫苗,但尚需进一步研究确定其抗病毒及预防效果。最近,研究表明使用 Tax 或 HBZ 多肽可以诱导出对 HTLV-1 感染和 ATL 进展起保护作用的免疫反应[76]。

五、标本的采集和储存

血清和血浆均适用于 HTLV 的血清学试验,可以在出现症状时抽取标本。疑似 HTLV 感染的血清阴性患者或蛋白免疫印迹试验不确定的患者,在检测 3 个月后应重新采集标本检测,以便找到处于血清阳转窗口期的潜在感染者[84]。除此之外,这些患者还可通过定性 PCR 检测,以进一步明确可能存在的感染。尽管 PCR 检测尚未获美国 FDA 批准,但已获得临床验证,可在商业参考实验室应用。待检血清和血浆标本应 4℃ 保存或冻存待以后使用。包装上应注明储存期限和对冻融次数的限制。含 DETA 或枸橼酸盐的抗凝管收集新鲜全血,因为 HTLV-1 和 HTLV-2 是细胞相关病毒,需用分离出的单个核细胞(Peripheral blood mononuclear cells, PBMCs),而非血清或血浆进行核酸检测(nucleic acid amplification testing, NAAT)和病毒分离。PBMCs 一般采用 Ficoll 密度梯度分离法(第 82 章)从新鲜全血中获得。由于肝素能干扰 PCR 过程中酶的作用,因此,不能用作 NAAT 试验中的血液抗凝剂。按标准程序提取 DNA 并在 −20℃ 保存直至使用。对于病毒培养,采用柠檬酸钠、EDTA 或肝素抗凝管收集全血,Ficoll 密度梯度分离法分离 PBMCs。

六、直接检测

(一) PCR 检测核酸

PCR 扩增前病毒 DNA 是确定感染状态、验证血清学试验结果、区分 HTLV 的 4 个型,以及

研究体内组织分布的首选方法[84]。定性 PCR，通过 *pol*、*env* 或 *tax* 基因及 LTR 上的引物，确定和区分 HTLV-1 和 HTLV-2（和近期发现的 HTLV-3 和 HTLV-4）感染（表 85-1）[2,44-45,72,85]。上述试验利用 HTLV 的一致性序列引物能扩增出所有的四型病毒，通过扩增产物与 HTLV 特异探针杂交或测序分析的方法实现分型。第二种方法是利用型特异的引物和探针分别扩增。PCR 产物可通过 Southern Blot 杂交标记的内部探针和测序法检测[44,85]。上述检测大多仅限于科研用途，但目前已有商业实验室可提供部分检测服务。商业参考实验室提供的血液 PCR 检测仅用于检测 HTLV-1 和 HTLV-2。商业实验室不提供脑脊液标本的检测。

用实时定量 PCR 可同时进行病毒检测和前病毒 DNA 定量；由于病毒是细胞相关的，血浆 RNA 病毒载量评估不适用于 HTLV 感染[29,44,46-47]。非商品化的实时定量 PCR 敏感性高，特异性强，检测范围较宽，可测到 10～10^6 拷贝/反应，该检测已经用于明确前病毒载量与发病机制及人群间传播风险之间关系的研究[25,86]。例如，HAM/TSP 和 ATLL 患者的前病毒载量高于无症状携带者，说明前病毒载量可能是未来疾病发展的预后指标[25,32,64,70,86]。

表 85-1 HTLV 感染的血清学和补充确认试验汇总

检测方法	描述	参考文献	在美国的可用性[a]
血清学筛查试验			
EIA	HTLV-1 和 HTLV-2 感染细胞裂解物和（或）重组抗原，通过比色读数的方法检测 HTLV 抗体。对 HTLV-1 和 HTLV-2 敏感性和特异性极高。对 HTLV-3 和 HTLV-4 检测的敏感性未知	25,45,82,91	一个 FDA 批准试验
ChLIA	与 EIA 相似，但通过化学发光方法检测	92	一个 FDA 批准试验
颗粒凝集试验	病毒裂解物包覆明胶或乳胶颗粒，与抗原特异性抗体结合，引起颗粒凝集，操作者肉眼判读		只用于科研
血清学补充试验			
WB	HTLV-1 病毒裂解物和（或）重组抗原用于检测 HTLV-1 和 HTLV-2 特异抗体。可能包括区分 HTLV-1 和 HTLV-2 抗体的重组抗原。HTLV-3 和 HTLV-4 有多变的蛋白免疫印迹表达谱	45,91,97	一个 FDA 批准实验
LIA	HTLV-1 和 HTLV-2 的重组抗原和多肽转印到膜上，可见单个病毒蛋白相关抗体条带。HTLV-3 和 HTLV-4 可出现多变的结果	45,91,98	只用于科研
IFA	抗体与 HTLV-1、HTLV-2 和 HTLV-3 感染的细胞结合，通过荧光标记抗人二抗进行检测，可区分 HTLV-1、HTLV-2 和 HTLV-3 抗体	25,45	只用于科研
核酸检测试验			
定性 PCR	采用 HTLV 共享序列引物扩增，再用 HTLV 特异引物、探针法对 HTLV 分型，或者直接通过序列分析区分 HTLV 不同型	44,83	确证实验可用于商业化实验室，但并未得到 FDA 的批准或 CE 认证
定量 PCR	使用简并引物和（或）型特异性引物，通过有限稀释法、定量竞争 PCR 或实时定量 PCR 检测前病毒 DNA 拷贝数	25,29,46,47,84	只用于科研

注：[a]FDA 批准，可用于献血者筛查，HTLV-1 和 HTLV-2 感染和相关疾病的临床诊断。研究仅用于科研，不用于临床（译者注：此处英文原文有误，根据上下文，此处应为 HTLV-3）

在标签病例（index case）中，性传播和母婴传播均与较高的 HTLV 前病毒载量相关[25,32,64,70,87-88]。因此，对 HTLV 前病毒载量定量有助于更好地了解病毒传播及疾病进展的相关性[25,32,64,70,87]。由于在不同研究中已经确定了无症状患者和患者之间 HTLV 前病毒载量存在差异，而且商业化实验室目前还没有标准化的定量 PCR 方法，因此，在这些研究中报道的前病毒载量约有 5 倍的差异[89]。通常情况下，健康携带者前病毒载量<3 拷贝/100PBMCs，而 ATLL 患者有 5～10 拷贝/100PBMCs[89]。

(二)病毒分离和鉴定

由于HTLV病毒是细胞相关病毒,病毒分离很困难[25,90]。但将HTLV感染的PBMC与活化的同种异体阴性PBMC或脐血细胞共培养可用于HTLV病毒分离。培养时间为4～6周,每周收集组织培养上清液,用仅限科研用途的抗原捕获试验(Zeptometrix Corp.,Buffalo,NY)检测上清液中的HTLV-1或HTLV-2 p19 Gag抗原。另外,可通过PCR测定组织培养中细胞DNA以监测感染情况。病毒分离和组织培养因耗时长、工作量大,一般不用于HTLV诊断,多用于进一步病毒特征研究。目前尚无HTLV-3和HTLV-4的体外分离培养的先例。

(三)病毒分型和血清学试验

所有献血者和出现相关临床症状的患者都应该进行HTLV-1和HTLV-2抗体检测。从1988年开始,美国对所有献血者用包含HTLV-1和HTLV-2抗原筛查HTLV-1和HTLV-2抗体[34,84,91]。此外,还对下述人群提供HTLV-1和HTLV-2检测:来自HTLV流行地区人群、有高危行为如共用注射器,以及与上述2类人群有性接触者。目前,在美国,HTLV-1和HTLV-2尚未列入常规生育或孕期检测。这与一些欧洲国家和西印度群岛不同,在上述地区医生推荐来自如日本等HTLV-1流行地区的孕妇和哺乳期妇女进行检测[24-25,34]。另外,在美国,所有富含白细胞的活细胞及组织(如造血干细胞、祖细胞和精液)的捐献者都需进行HTLV-1和HTLV-2筛查[92]。然而,因为美国HTLV-1/2阳性移植器官的接受者预后较好,以及在美国HTLV-1感染发生率低,在2009年,器官获取移植网络/器官共享委员会联合网络取消了移植前对死亡捐赠者进行HTLV-1/2检测的要求[92]。器官获取组织实验室可以继续对捐赠者进行常规的筛查,包括活体捐赠者和HTLV感染风险增加的捐赠者。器官接受者如果存在任何HTLV感染的症状,也应进行HTLV检测。尽管如此,在HTLV高流行地区预先对器官捐献者进行筛查仍要谨慎进行。

最常用的筛查试验是检测血清或血浆中的HTLV抗体[25,33,84]。人们已经非常清楚HTLV的结构蛋白和调节蛋白的免疫显性区特征,常用于HTLV-1和HTLV-2的诊断及分型试验。表85-1描述了HTLV-1和HTLV-2的主要检查方法。血清学试验策略包括:首先进行初筛试验,然后进行确认试验和HTLV分型鉴定(图85-2)。目前尚无特异性检测和区分HTLV-3和-4的试验[93]。

初筛试验包括酶免疫测定(enzyme immunoassays,EIA)、化学发光免疫测定(chemiluminescent immunoassays,ChLIA)、颗粒凝集试验(Fujirebio America,Fairfie, NJ)和免疫荧光试验(immunofluorescence assays,IFAs)(表85-1)。EIAs是一种敏感而简单的比色试验,需要用纯化的HTLV感染细胞裂解产物和(或)重组抗原或合成肽。ChLIA与EIA相似,但需要化学发光检测步骤,与只包含HTLV-1抗原的检测相比,增加了HTLV-2抗原的筛查试验能显著提高对HTLV-2抗体的检测能力[25,94]。EIA和ChLIA可以自动化及大规模应用[94]。然而,由于HTLV-1和HTLV-2结构蛋白序列的显著一致性,EIAs和ChLIAs均不能区分这2种病毒感染;因此,上述筛查试验可称为HTLV-1/2感染筛查试验。

对包括HTLV-1和HTLV-2抗原在内的多种商品化筛查试剂进行比较分析,发现上述试剂对确认HTLV-1阳性标本的检测敏感性为98.9%～100%,对确认HTLV-2阳性标本的检测敏感性为91.5%～100%,特异性为90.2%～100%[25,95-96]。目前,一个HTLV-1/2 EIA(Avioq HTLV-Ⅰ/Ⅱ Microelisa System, Avioq, Inc., Research Triangle Park,NC)和一个HTLV-1/2 ChLIA(Abbott PRISM HTLV-Ⅰ/HTLV-Ⅱ, Abbott Laboratories, Abbott Park, IL)试剂已经获得FDA批准在美国使用。Avioq试验曾被称作Vironostika HTLV-Ⅰ/Ⅱ微量酶联免疫测定系统,由bioMérieux生产,但在一段时间内并未在美国销售。这2种FDA批准的检测敏感性估计在100%[95%可信区间(CI)为Avioq 99.97%～100%,Abbott 99.89%～99.96%]。临床试验数据报道Abbott PRISM HTLV-Ⅰ/HTLV-Ⅱ特异性为99.93%(95%*CI* 99.89%～99.96%),Avioq为99.95%(95%*CI* 99.89%～99.98%),研究结果均支持这些检测获得FDA许可。美国红十字会的一项独立研究也表明Abbott Prism的敏感性为100%(95%*CI* 99.48%～100%)[33]。这2

种试验可用于献血者的筛查、辅助 HTLV-1 和 HTLV-2 感染及相关疾病的辅助诊断。人们正在努力研制一种通过双重 EIA 算法提高 HTLV 试验的预测价值的方法(图 85-2)[33,97]。目前集合标本(pooling of samples)已被提议用于血清流行病学研究,但并不推荐用于血液捐献者检测[98]。

来自某些特定 HTLV 流行地区的标本,其 HTLV-1 和-2 抗体滴度低,或在血清转换早期,尽管多数筛查检测敏感性高,仍可能在 EIA 筛查中漏检。可采用 NAAT 检测抗体滴度低或在抗体反应出现前的窗口期(中位窗口期为 51 天,36～72 天)内的感染者[33]。然而,尽管 NAAT 检测可能实现商品化,但尚未获得 FDA 批准,也未通过欧洲认证。

HTLV-1 和 HTLV-2 补充确证试验或分型试验包括利用重组蛋白的病毒裂解产物进行的蛋白质印迹法(Western blots,WB)、线性免疫测定(LIAs; Innogenetics, Ghent, Belgium)和 IFAs(表 85-1)。尽管采用纯化的病毒裂解产物的 WB 试验检测 p24 和 p19 Gag 抗体高度敏感,但并不总能检出天然的 Env 糖蛋白的抗体。第二代确证试验的替代方法是改良的 WB,包括了 HTLV-1 和 HTLV-2 型特异性 gp46 Env 重组蛋白,以及截短型重组 p21 Env(r21e),r21e 降低了非特异性反应,提高了检测性能(特异性和敏感性),并能够区分 HTLV-1 和 HTLV-2 (MP Diagnostics WB 2.4; MP Biomedicals, Science Park, Singapore)(图 85-3)[99]。MP 诊断 WB 试剂在 2014 年 12 月获得 FDA 批准,用于检测人血清和血浆中 HTLV-1 和-2 抗体。

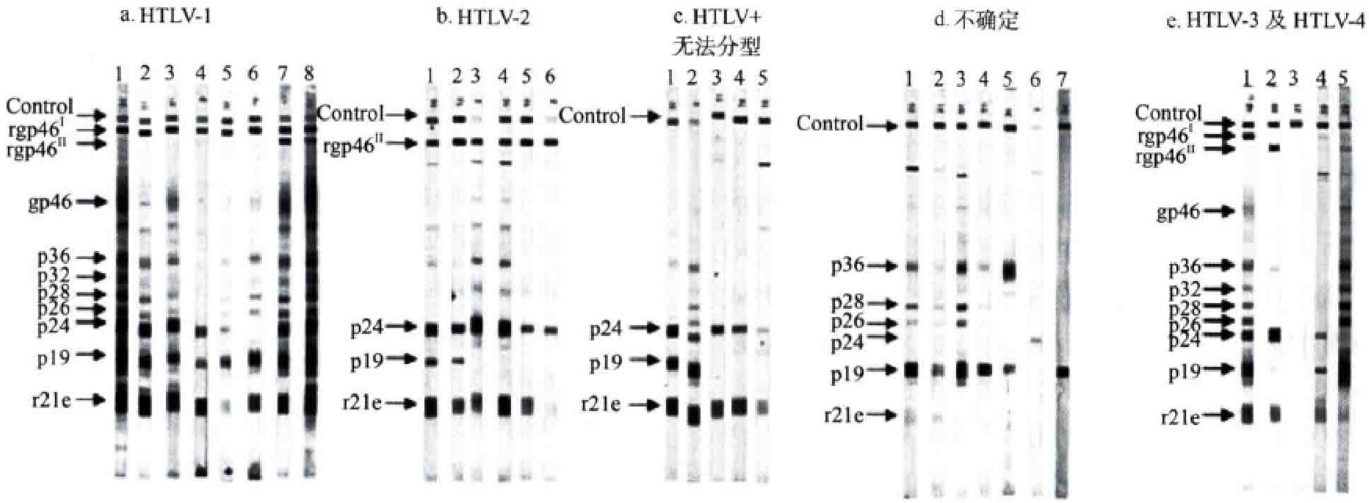


图 85-3　蛋白免疫印迹(Western blot,WB)分析代表性患者血浆或血清标本(a)HTLV-1、(b)HTLV-2、(c)HTLV-1/2 无法分型、(d)不确定和(e)HTLV-3,以及 HTLV-4。MP Biomedical WB 包被的抗原(HTLV-2.4 版本)包括 HTLV-1 抗原刺突,重组 r21e(HTLV-1 和 HTLV-2 共有),以及 HTLV-1(rgp46^I)和 HTLV-2(rgp46^II)2 个特异性的外部包膜重组蛋白。a. 典型的 HTLV-1 反应模式(1-5 泳道),缺少 p24 Gag 应答的非典型反应(泳道 6),高抗体滴度的标本,表现为与 2 个 rgp46 蛋白均反应(泳道 7、8;反应中血清滴度仅针对 rgp46^I)。b. 典型的 HTLV-2 反应模式(泳道 1～6,与 p24 条带发生的反应强于 p19,后者在 HTLV-2 感染者血清中常缺如)。c. HTLV-1/2 阳性但无法分型的标本,与 Gag(p24,有或无 p19)及 r21e 有反应,但与 gp46^I 和 gp46^II 无反应。泳道 1 和 2:补充试验常发现 HTLV-1 感染标本的特征性模式;泳道 3-5:补充试验常发现 HTLV-2 感染标本的特征性模式。d. 典型的 HTLV 不确定样本反应模式。图中所示为典型的 HTLV Gag 不确定反应模式,在来自热带地区(中非、巴布亚新几内亚等)(泳道 1-4)和低危人群(泳道 5～7)的血浆或血清标本常出现。绝大多数具有上述反应性的标本,通过 PCR 检测,证明无 HTLV-1 和 HTLV-2 感染。e. 喀麦隆地区 HTLV-3(泳道 4)和 HTLV-4(泳道 5)感染者的血清反应性。1 例 HTLV-3 感染者的血浆与 p24、p19、r21e 及 rgp46^I 反应较弱,另 1 例 HTLV-4 感染者的血浆与 p24、r21e 及 rgp46^II 反应较弱,但与 p19 反应很强,这与 HTLV-1 感染标本相似。泳道 1 和泳道 2 分别为来自于 HTLV-1 和-2 感染者的标本,泳道 3 为阴性对照标本,见彩插

LIA 是另一种补充试验，含有印在试纸条(INNO-LIA，Innogenetics)上的重组和合成 HTLV-1 和 HTLV-2 特异性抗原[100]，可区分 HTLV-1 和 HTLV-2 感染。IFAs 检测标本中与 HTLV-1 或 HTLV-2 感染细胞结合的抗体，可用于区分 HTLV-1 和 HTLV-2 感染，并可确定抗体滴度[24-25]。WB 和 LIA 确证/补充性试验已在欧洲和其他流行地区(巴西、阿根廷、西印度群岛、伊朗和日本)获得许可，用于确认 EIA 重复检测为阳性的标本[34]。

HTLV-3 和 HTLV-4 能在使用商品化 EIAs 和 WB 试剂或使用 HTLV-1 和-2 抗原的研究型 IFAs 的研究中被检测出来[2,45,93]。这些检测对于新型 HTLV 的敏感性尚不清楚，WB 或 LIA 检测范围较宽，容易与 HTLV-1 和 HTLV-2 混淆。因此，在分辨特定型别 HTLV 感染时，PCR 和序列分析发挥关键作用。

七、结果的评价、解释和报告

图 85-2 中列出了用于诊断的 HTLV 检测的典型流程。如初筛免疫检测(EIA 或 ChLIA)阳性，则对同一标本做双份重复试验。如果一次或两次重复检测结果为阳性，则将标本定义为重复阳性(repeatedly reactive，RR)。RR 样本需进行补充确证试验，如 WB 方法可行一般采用该方法(图 85-3 和表 85-1)。根据 1992 年的检测数据，美国公共卫生署(Public Health Service，PHS)推荐的用以确证 HTLV-1 和 HTLV-2 血清学阳性的补充实验的诊断标准包括：p24 Gag 的抗体阳性和天然 gp46 Env 和(或)r21e 的抗体阳性[84]。后来的基于更敏感试验的数据提示，应该考虑 WB 反应性的不同模式。第二代改良的 WB 是全世界普遍采用的研究型 WB 试验(MP Diagnostics WB 2.4)。对 p19 Gag(有或无 p24 Gag)、r21e 和 rgp46^{I} 发生反应的标本判断为 HTLV-1 阳性(图 85-3a)。对 p24 Gag(有或无 p19 Gag)、r21e 和 rgp46^{II} 发生反应的标本判断为 HTLV-2 阳性(图 85-3b)。不与任何 WB 条带发生免疫反应的样本判断为 HTLV-1 和 HTLV-2 抗体阴性(假阳性 EIA 样本)。与 p24 Gag(有或无 p19 Gag)和 r21e 反应，但不与 rgp46^{I} 和 rgp46^{II} 反应的标本为 HTLV 阳性但无法分型(图 85-3c)，因为在一些未分型的样本中 PCR 检测发现了 HTLV 特异性序列[2,44,85]。这类反应可能提示存在不同型 HTLV，如 HTLV-3 和 HTLV-4。然而，至今为止，HTLV-3 和 HTLV-4 只在喀麦隆发现过[2,12-14]。LIA 实验结果解读也采用相似的标准(见生产商操作说明)。

WB 和 LIA 都可能出现不确定结果(对单一 HTLV 基因产物有免疫反应或对多个条带有免疫反应，但未达到血清学阳性判定标准)(图 85-3d)。在 EIA 反应性标本中，最常见的不确定模式是只出现针对 Gag 蛋白(p24、p19)的抗体，这是一个值得深入研究的领域[101-104]。在低危血清学不确定的人群中，大量采用引物检测多个基因区域的 PCR 研究均未检测到 HTLV-1 或 HTLV-2 前病毒序列，提示这些人并无 HTLV-1 或 HTLV-2 感染[44,83,101-104]。这些未确定的 WB 结果可能代表了一种与 HTLV 部分同源的新逆转录病毒，但采用能够检测 HTLV 相关病毒的通用 PCR 引物，除了 HTLV-3 和 HTLV-4 外[2,4-6,51]，并未发现病毒 DNA 扩增[44,83,103-104]。有限的研究表明，WB 不确定的个体通常不具备 HTLV 感染的危险因素[101-104]。低危人群中 WB 不确定结果的可能代表不同病毒、微生物及细胞抗原的抗体与 HTLV 蛋白存在交叉反应[101-104](图 85-3e)。对于有潜在 HTLV 感染危险因素的人群，包括在流行地区居住、有 1988 年之前输血史或有静脉吸毒史、有未使用安全套保护的多个性伴或性伴、父母来自流行地区，WB 阳性结果具有更高的预测值[25,84]。

在极少数情况下，确认 HTLV 感染的标本会出现对 p19 Gag(p24 Gag 缺失)和 r21e 有反应性的 WB 不确定结果[25,101]。同样，在某些情况下，对 r21e 的抗体可能代表了血清转换过程中的早期抗体应答[25,84]，有上述反应性的个体，应在 3 个月内通过 EIA 和(或)PCR 复检[84]。

近期数据表明，极少数美国慢性进行性神经疾病患者 HTLV 的 WB 检测结果不确定，这些患者可能感染了缺陷型 HTLV 或 HTLV-1 拷贝数低[101]。最近，日本和阿根廷的研究也报道了低前病毒载量与 HTLV-1 WB 结果不确定的关系[105-106]。而且，这两项研究也发现了基因突变能够影响抗原的检测，可能导致 WB 检测结果的不确定性。对于有临床神经症状或来自 HTLV-1/2 高发地区(如非洲、亚洲、南美和加勒比)，但

HTLV-1/2 WB 反应不确定的患者，应该进一步进行 NAAT 检查，也需排除 HTLV-3 和 HTLV-4 感染。

筛查试验 ChLIA 的结果及阳性标本使用获得许可的第二种筛查试剂和 HTLV WB 检测的结果是目前美国决定接受献血和延迟献血的基础。最终确认 HTLV-1 或 HTLV-2 抗体阳性者将永久性推迟献血[33,38]。如果血浆样本筛查结果为 RR，但并未确认 HTLV-1 或 HTLV-2 血清阳性（包括 EIA 假阳性、复查不确定样本和未进行复查的样本），这样的献血者应被告知，如果两次独立献血中检测结果相同，应推迟其献血[33,38,84]。因为假阴性结果对公众健康有影响，筛查试验更偏重于敏感性而非特异性[107]。对于一个没有已知危险因素的献血者，采用单一试剂盒检测的 RR 结果更可能是假阳性反应。检测结果的阳性预测值（positive predictive value，PPV）始终与筛查人群的患病率有关，1988 年实施筛查后，在献血者中的 HTLV 患病率极低[48]。流行率越低，PPV 就越低，检测的特异性也越低。因此血标本常规采用双筛查试验策略（图 85-2），以提高检出实际感染的可能性[33,38,97]。因为每种单一筛查试验的敏感性相似但非特异性反应不同，那么标本在两种试验中均为阳性很可能为真阳性[33,38]。尽管如此，美国筛查重复阳性（RR）的献血者中还会出现 WB 不确定结果，但几乎所有此类病例 PCR 结果均为 HTLV 阴性[85]。因此，为确定这些人的感染情况，有必要进行额外的 PCR 检测或在稍后时间点采集标本进行检测。许多研究报告显示，在美国，感染和非感染的献血者中，WB 和 PCR 结果高度一致[33,107-109]。另外，也建议使用 NAAT 代替 WB 用于筛查重复阳性（RR）标本的确认，但需要全血或 PBMCs，而且并非快速检测方法[110]。2011 年的一项研究表明，对于使用现已停用的 EIAs 方法检测获得 RR 结果但未经确认阳性的推迟献血者，如果当前样本用更敏感和特异的 ChLIA 检测为阴性，则可以重新认定有献血资格[33]。

根据美国 CDC 公共健康服务工作组制定的指南，HTLV-1 或 HTLV-2 阳性或结果不确定者应予以告知[84]。尽管该指南在 1993 年发布，但 HTLV 传播的流行病学并未改变，因此，该指南仍然有效。指南规定，人们应该了解到 HTLV 并非 HIV，它发展成 HTLV 相关疾病的风险很低。HTLV-1 或 HTLV-2 感染者不允许捐献血液、精液、器官或其他组织，不能与他人共用针头和针管。为了防止 HTLV 传播，应建议感染者在性行为过程中采取保护措施，妇女应避免哺乳。对间隔 3 个月以上的 2 次检测结果不确定的人，应告知其在筛查试验中对 HTLV-1/2 有反应性，但无法通过更特异的试验确认。进而，应让他们了解不确定的 HTLV-1 或 HTLV-2 结果极少是由 HTLV-1/2 感染引起的。对检测结果不确定者，应提供重复的血清学和（或）PCR 检测。

使用商品名称仅为了加以鉴别，并不意味着得到了美国卫生部、公共健康服务或 CDC 的认可。本文中的研究发现和结论均来自其作者的观点，并不代表 CDC 的观点。

参考文献请扫二维码查阅

第 86 章　流感病毒*

ROBERT L. ATMAR

（王一民　译；王辉、曹彬　审校）

一、分类

流感病毒（influenza viruses）是正黏病毒科（*Orthomyxoviridae*）成员。根据其基质蛋白（matrix protein，M）和核蛋白（nucleoprotein，NP）这2个主要结构蛋白的抗原差异和病毒基因组的进化分析将流感病毒分为4个属：甲（A）型流感病毒、乙（B）型流感病毒、丙（C）型流感病毒和丁（D）型流感病毒。这4个属的成员也分别称为A型、B型、C型和D型流感病毒。根据2个主要表面糖蛋白血凝素（hemagglutinin，HA）和神经氨酸酶（neuraminidase，NA）的特征，甲型流感病毒可进一步分为不同的亚型。利用针对不同亚型抗原的动物超免血清进行免疫双扩散实验，不同亚型之间由于缺乏交叉反应而得以区分[1]。目前，已经确认的有18种HA亚型和11种NA亚型[2]。在同一亚型内，毒株可进一步基于基因序列的系统进化分析而分为不同的系或者分支。例如，欧亚系的高致病性H5N1病毒株分为不同分支，并进一步将流行株分为第2、第3、第4和第5级分支[3]。乙型流感病毒没有亚型，但可以分为两个抗原性不同的谱系：B/Victoria和B/Yamagata。

以下信息用于病毒株的命名：类型、物种起源（如果非人类）、分离毒株的地理位置、实验室编号、分离年代和亚型（仅甲型流感病毒）。例如，一般人流感病毒株命名为：A/得克萨斯/50/2012（H3N2），而A/鹌鹑/越南/36/2004（H5N1）是一次在亚洲的动物流行病中一株禽流感病毒的名字。

二、病原概述

正黏病毒科是有包膜的、单负链、分节段RNA病毒。A型流感病毒和B型流感病毒有八个RNA片段，而C型和D型流感病毒只有七个片段。基因区段的长度为800～2500个核苷酸，整个基因组是10.0～14.6 kb。当2株病毒感染同一个细胞时，可发生1个或多个基因片段的交换。这种交换称为基因重配（genetic reassortment），产生的新毒株基因组来自2个亲本病毒。人流感病毒和禽流感病毒的基因重配产生了1957年的A型（H2N2）和1968年的A型（H3N2）大流行株，并且与2009年的A型（H1N1）大流行株和中国人感染的A型（H7N9）禽流感病毒的产生有关[4]。

在连续培养传代后，流感病毒呈球形和多形性，直径为80～120 nm。也会呈现丝状，长达几微米。其脂质包膜来自宿主细胞膜，在成熟病毒颗粒出芽时获得，病毒表面的HA呈棒状突起，而NA呈球形末端突起。顾名思义，HA能通过结合唾液酸残基凝集哺乳动物[（例如，人（O型）、豚鼠、马]和禽类（如，鸡、火鸡）的红细胞。病毒的抗原性主要由HA蛋白决定，使用免疫血清可以识别病毒的HA蛋白。脂质膜包裹着核衣壳，核衣壳是螺旋对称结构，由基因组RNA片段、多套聚合酶蛋白及NP蛋白组成。基质蛋白1（M1）位于核衣壳和包膜之间，基质蛋白2（M2）构成A型流感病毒包膜上的离子通道。

*本章包含 Robert L. Atmar 和 Stephen E. Lindstrom 在本手册第11版第84章中呈现的部分内容

三、流行病学和传播

在温带地区，流感病毒会造成每年的流行，而在热带地区，季节性不明显，可以在一年四季分离到流感病毒。在北半球的温带地区，流行一般发生在十二月和三月，在南半球，流行期通常是五月到八月间。流行的特点是发热性呼吸疾病突然增加，上学和工作缺勤增加，在同一个社区，流行期通常持续 3～8 周。通常其中一个亚型(A 型)或型别(B 型)的流感病毒占主导地位，但流行时也会出现 A 型和 B 型病毒同时或 A 型流感病毒两个亚型同时存在的情况。全球性流行或大流行的发生频率较低，而且仅发生在 A 型流感病毒。含有新的 HA 的 A 型流感病毒出现后可能导致大流行，其可以很容易地在人与人之间传播。流感大流行毒株可能是由人流感病毒和动物流感病毒共同感染易感宿主发生基因重配而产生，或由禽流感病毒逐步适应哺乳动物宿主而产生。C 型流感病毒会导致人出现无症状或轻微的呼吸道疾病。D 型流感病毒感染猪和牛，但它们不感染人类[5]。

流感病毒主要通过打喷嚏、咳嗽和说话产生的飞沫实现人与人之间的传播。直接或间接(污染物)接触污染的分泌物和小颗粒气溶胶已被注意到是另一个潜在的传播途径。流感病毒这些不同传播途径的相对重要性，尚未确定[6]。对于禽流感病毒引起的人类感染，直接接触受感染的禽类是最常见的传播因素，直接经咽喉或胃肠道接种可能会导致感染[7-8]。

1997 年，在香港发生了几起人感染 H5N1 病毒的病例和与之相关的一次大规模的禽流感暴发。自此关于禽流感病毒造成流感大流行的可能性引起关注。当时疫情通过屠宰所有香港家禽得到控制，但 2003 年，H5N1 病毒再次在中国的禽中暴发。到 2005 年底，该病毒已扩散到亚洲的其他地区，以及欧洲、非洲和中东的部分地区。人感染 H5N1 病毒与禽流感暴发直接相关，到 2017 年，全球已经报告了超过 850 例病例，多数在东南亚，但在中东和北非也有数例病例报告。多数病例是由于直接接触受感染的禽类而感染，不过也存在有限的人传人[7]。禽流感病毒发生数个基因位点突变后，才能在哺乳动物细胞中高效复制，也能通过液滴气溶胶在人感染动物模型—雪貂之间传播[9,10]。H5N1 病毒持续进化并且多样性增加，使其获得有效人间传播能力的可能性增加。

其他 A 型禽流感病毒亚型也值得关注。2003 在荷兰商业化家禽养殖场暴发 H7N7 病毒疫情，并导致超过 400 人发生呼吸系统疾病，造成一人死亡[11]。自 2013 年以来，H7N9 病毒已在中国的家禽市场中出现，已感染 1200 多人[12]。偶尔观察到人类感染其他的禽流感病毒亚型。上述感染类似于人感染 H5N1 病毒的案例，其最大风险也是暴露于感染的家禽。

猪是另一种产生可以感染人的新型流感病毒株的来源。在 2009 年，一种新的 A 型 H1N1 流感病毒(pdm09)最初就被确定为是造成墨西哥和美国严重发热相关呼吸疾病的原因。这种病毒迅速蔓延到世界许多国家，促使世界卫生组织(Word Health Organization，WHO)宣布流感大流行开始。这种新毒株随后取代了先前流行的季节性 H1N1 毒株。近年来，在美国几个州都发现了 HA 蛋白抗原性不同的另一种猪流感病毒(例如，变异的 H3N2)[13]。幸运的是，这些变异的病毒没有像 H1N1pdm09 那样在人间传播，大多数情况下都是直接或间接接触猪而感染，可以根据流行病学暴露情况进行预警。流感病毒能够从禽和猪传播到人，显示了加强相应预警监测的必要性。

四、临床意义

A 型和 B 型流感病毒感染的典型症状是发热症状相关呼吸系统疾病，包括发热、咳嗽、上呼吸道症状(如咽痛、流鼻涕、鼻塞)和全身症状(如头痛、肌肉酸痛、萎靡不振)。这种症状称为流感，从无症状感染到病毒性肺炎等其他临床表现都可能会发生。在 1～5 天的潜伏期(平均 2 天)后突然发病[译者注：2018 年美国“感染病协会季节性流感的诊断，治疗预防性用药和暴发的管理”及中国“流行性感冒诊疗方案(2019 版)”流感潜伏期 1～7 天，多为 2～4 天]。发热一般持续 3～5 天，但干咳和不适可能持续数周。并发症包括儿童中耳炎、鼻窦炎、病毒性肺炎、继发细菌性肺炎、心脏或肺部基础性疾病加重、肌炎(包括横纹肌溶解)、神经系统问题(癫痫发作、急性脑炎及感染后脑病)、瑞氏综合征(与阿司匹林的使用有关)、心肌心包炎和死亡[14-16]。相比之下，C 型流感病毒仅引起轻度呼吸

系统症状，临床上与普通感冒不能区分。

A 型（H5N1）流感病毒和 A 型（H7N9）流感病毒也会引起发热相关呼吸系统疾病，不过下呼吸道症状更为多见。有的患者没有上呼吸道症状，部分患者发生胃肠道症状（水样腹泻、呕吐、腹痛）[7,17]。可能发生急性脑炎。H5N1 病毒感染会导致较高的病死率（约 60%），大多数患者死于进展性肺炎。尽管 H7N9 病毒感染的严重程度总体低于 H5N1 病毒，但死亡率仍至少为 30%[17]。死于 H5N1 或 H7N9 病毒感染的住院患者中，患者的年龄和潜在基础疾病也有差异[18]。死亡病例比存活病例的病毒复制时间长，血浆中几种炎症介质（例如，白细胞介素-6、白细胞介素-8、白细胞介素-1β）的水平高。存活的患者在发病后 10～14 天可发展出具有可检测水平的血清抗体反应。

A 型和 B 型流感病毒感染可在社区迅速传播，在一个封闭空间中暴露于共同感染源之后，有记录表明临床感染率可高达 70%。疾病的流行导致住院率的增加，特别是儿童和老年人，并且导致老年人的病死率增加。在过去的 20 年里，由 A（H3N2）亚型流感病毒流行造成的病死率比 H1N1 型或 B 型病毒高。更进一步的关于临床表现和并发症等信息可在临床教科书中找到[14-15]。

5 种已获许可的抗病毒药物可用于治疗流感病毒感染。金刚烷胺和金刚乙胺是 M2 离子通道阻断剂。金刚烷类化合物对 B 型流感病毒无作用，而目前流行的 A 型流感病毒对其产生了耐药性，因此其不能作为 A 型流感病毒的单一临床治疗药物。扎那米韦、奥司他韦和帕拉米韦是神经氨酸酶抑制剂，对 A 型和 B 型流感病毒均有抗病毒活性。免疫功能低下患者抗病毒治疗后可能出现具有明显临床意义的耐药性。应在症状开始出现的 2 天内使用抗病毒药物才有明显的临床效果，但是病毒阳性的住院患者可在任何时间开始用药[19]。这些药物也被用于预防流感，但每年接种三价或四价流感疫苗是预防流感的主要手段。

灭活流感疫苗（inactivated influenza vaccines，IIVs）、流感病毒减毒活疫苗（live attenuated influenza virus，LAIV）及重组血凝素疫苗（recombinant hemagglutinin vaccine，RIV）已在美国获批[20]。IIVs 来自于细胞（ccIIV）或鸡胚培养的病毒，收获并灭活后制备疫苗。病毒蛋白经部分纯化和标化，每剂含有 15μg 的 HA 蛋白。IIVs 可以是三价（IIV3）或四价（IIV4），三价疫苗含有 A（H1N1）、A（H3N2）和 B 型病毒株，四价疫苗包括 B 型流感病毒的 2 个谱系（B/Victoria 和 B/Yamagata），以及 A（H1N1）和 A（H3N2）病毒株。含有 60μg HA 蛋白的高剂量 IIV3 和含有 15μg HA 蛋白的以 MF59（译者注：MF59 佐剂是一种水包油的乳剂，包含 1% 鲨烯，0.5% Tween80 和 0.5%三油酸聚山梨酯的水包油乳液）为佐剂的 IIV3 可用于 65 岁及以上的老年人。RIV3 和 RIV4 疫苗包含 45 μg 重组杆状病毒表达的 A（H1N1）、A（H3N2）和一系或两系 B 型毒株的血凝素。LAIV4 疫苗是四价，与 IIV4 包含相同的毒株。每一株重配疫苗病毒含有来自亲本减毒流感病毒的六个内部基因（A 或 B）及 WHO 推荐的疫苗株的 HA 和 NA 基因。由于病毒在上呼吸道复制，因此该疫苗通过鼻腔内给药[21]。该疫苗在美国被批准用于 2～49 岁人群。由于 3 年来该疫苗对甲型流感病毒抑制效果不佳，导致近 2 年美国免疫实践委员会（ACIP）不推荐使用该疫苗[20]。2018 年 2 月，ACIP 对 LAIV 疫苗的使用更新了推荐意见，这是由于该疫苗纠正了 H1N1 病毒成分复制适应性低的问题，而这是造成 LAIV 有效性低的可能原因。美国使用流感疫苗的最新指南可在 https://www.cdc.gov/flu/protect/keyfacts.htm 线上找到。

由于病毒的不断进化导致 HA 蛋白的抗原变化，流感疫苗中包含的病毒需要定期更新。由世界卫生组织每年 2 次选择被列入疫苗的毒株。北半球国家的疫苗株在一月和二月被选定，以使疫苗在九月使用。新疫苗的替代品，包括经其他途径给药和联合使用佐剂的临床研究正在进行中。

五、标本的采集、运输和储存

流感病毒感染呼吸道上皮细胞，可在所有类型的呼吸道分泌物中发现。无并发症的感染其临床症状的严重程度和病毒的排毒水平相关，在发病的最初几天最高。样品应在这个时候（最初的 2 或 3 天）收集，以最大限度地提高病毒检出的可能性。通常，各种上呼吸道标本单独或组合用于病毒的鉴定，包括鼻腔分泌物、鼻腔冲洗液、鼻腔或鼻咽拭子、咽拭子、咽冲洗液。从咽部采集的样品病毒滴度往往较低，导致检测往往不够敏感[22-23]。然而，对 H5N1 病毒和 H7N9 病毒感染者的检测显示咽部样本和下呼吸道

标本可能比从鼻腔采集的标本有更高的诊断率[7,24]。下呼吸道标本，包括痰、气管吸出物、支气管肺泡灌洗液，可能会检出病毒。一些研究发现，痰的病毒载量高于上呼吸道样本[25-26]。偶尔可以在非呼吸系统临床样本中检测到病毒[7]。

采集之后，临床标本应放在病毒转运培养基中。多种转运液适于流感病毒，包括牛肉浸液肉汤、Hanks 平衡盐溶液、胰蛋白磷酸盐肉汤、蔗糖磷酸缓冲液和市售的细胞培养基。所有这些培养基辅以 0.5% 牛血清白蛋白或 0.1% 明胶以稳定病毒和抗微生物药物(抗生素和抗真菌药物)来抑制其他呼吸道菌群生长。然而，转运液的使用可能会影响某些市售的病毒检测试验的检测结果，如果这些试剂被用于诊断，在其包装说明书中应加以说明(表 86-1 和表 86-2)。当标本被置于转运液中并保持在 4℃，流感病毒的感染性可持续达 5 天[27]。临床样本采集后应该在上述条件下尽快运送到诊断实验室。如果标本在此期间不能被培养，应立即存放在 −70℃；在较高的温度下(−20℃)存储会导致病毒活性的丧失。用免疫荧光检测脱落的上皮细胞中的病毒抗原需要将标本采集后立即运输和处理。

六、直接检测

(一)显微镜检查

通过电子显微镜(electron microscopy，EM)可直接和间接地观察到临床标本中的流感病毒的典型形态。免疫电镜一直是最敏感的电镜方法，利用特异高免疫血清可以区分病毒型别和亚型[28]。然而，使用这种检测方法要求临床样本中有大量的病毒($>10^5\sim10^6$/ml)才能检测到。因为需要有经验的检测人员，并需要电子显微镜设备，检测成本相对较高，而且其他诊断方法具有更高的敏感性，因此电镜不常用于流感病毒感染的诊断。

(二)抗原检测

抗原检测试验使用不同方法以快速检测在临床标本中的流感病毒及确认在培养物中的分离株。这些方法的基础是检测病毒蛋白与特定抗体的相互作用。有多种不同方法，包括直接和间接荧光抗体(fluorescent antibody，FA)染色、酶联免疫、免疫层析法和荧光免疫分析。

FA 检测上呼吸道分泌物中感染并脱落的上皮细胞表面或内部的病毒抗原。通过拭子或抽吸或冲洗液收集细胞，在低温缓冲液中洗涤以去除黏液并固定于显微镜玻片上。加到玻片之前进行细胞离心可以改善待评价的细胞数量和细胞形态，提高检测的准确性。在固定后的细胞上加入病毒特异性抗体；使用针对病毒蛋白的单克隆抗体(例如 M、NP)比多克隆抗血清具有更高的特异性，其具有保守性，能够大量表达，并可从多个厂家购得。直接 FA 法(direct fluorescent antibody，DFA)使用一种能够与病毒特异性抗体结合的荧光染料进行检测，间接 FA 法(indirect fluorescent antibody，IFA)需要使用与病毒特异性抗体结合的第二抗体。用荧光显微镜可以检测抗体染色后的细胞。污染的黏液可导致非特异性荧光，可将标本经 N-乙酰半胱氨酸或二硫苏糖醇处理，以及通过 Percoll 离心细胞而减弱。DFA 和 IFA 检测需要 2～4 h，不过一些诊断实验室将样品批量检测，并不是收到标本后立即进行检测，导致检测结果的延迟。理论上，IFA 检测应该比 DFA 检测敏感性高而特异性低，但在已发表的报告中，这些检测在敏感性(50%～90%)和特异性(一般>90%)上有明显的重叠[29]。敏感性较低可能是由于实验室专业知识欠佳或设备故障所致[30]。FA 法检测的优点是可以通过观察是否有足够数量的上皮细胞来判断样品的质量。此外，有可筛选其他呼吸道病毒(例如，呼吸道合胞病毒、副流感病毒、腺病毒)及 A 型和 B 型流感病毒的试剂盒(表 86-1)。这些多重检测方法可以有效地筛查其他病毒引起的发热相关呼吸系统疾病。缺点是需要专门的设备(荧光显微镜)，受技术人员专业知识对检测性能特点分析的影响(即敏感性和特异性)。各实验室应确立能与细胞培养可比的自己的检测性能特点。

一些免疫学方法使用不同的报告形式(比色、荧光和色谱图)，并已用于临床标本中流感病毒抗原的检测。这些方法中，许多至少需要 2 h，与培养方法相比敏感性为 50%～80%。流感快速诊断检测(RIDT)试剂盒使用免疫学方法快速(≤30 min)检测临床标本中的 A、B 型流感病毒，比其他抗原检测方法更为常用(表 86-2)。这类试剂盒利用单克隆抗体通过酶联免疫分析或层析免疫分析来检测 A 或 B 型流感病毒核蛋白的存在。所有的试剂盒在30 min内出结果，其中一些可以用于现

表 86-1 用于 A 型或 B 型流感病毒荧光抗体染色的商业化试剂盒[a]

检测方式	试剂盒名称(生产厂家)	可直接用于检测的临床标本;细胞培养确认	评价	流感病毒检测的型别	产品手册中用于直接检测的敏感性/特异性	产品手册中用于分离物确认的敏感性/特异性	能够检测的其他病毒
DFA	D^3 Ultra DFA 呼吸道病毒筛查检测试剂盒(Diagnostic Hybrids, Inc.)	NA, NPA, NW;细胞培养	对病毒特异性的 MAbs 混合物进行筛选和鉴定	A 和 B	A:100%,100% B:100%,98.7%~100%	A:100%,100% B:100%,100%	Ad, P1, P2, P3, RSV
DFA	D^3 Duet DFA 呼吸道病毒筛查试剂盒(Diagnostic Hybrids, Inc.)	NA, NPA, NPS, NS;细胞培养	区分流感病毒 A 与其他呼吸道病毒;这些病毒(包括流感病毒 B)必须通过 Ultra 试剂盒来鉴定	A 和 B	A:99%, A 和 B100% B:100%,100%	A:100%,100% B:100%,100%	Ad, P1, P2, P3, RSV
DFA	D^3 FastPoint DFA 呼吸道病毒筛查试剂盒(Diagnostic Hybrids, Inc.)	NA, NPA, NPS, NS, NW	区分流感病毒 A 与流感病毒 B		A:82.9%~100%, 97.5%~100% B: 66.7%~100%, 99.7%~100%	N/A	
DFA	Imagen 流感病毒 A 和流感病毒 B 型(Thermo Fisher Scientific.)	NPA;细胞培养	对病毒特异性的 MAbs 混合物进行筛选和鉴定	A 和 B	A: 96.2%, 100% B: 86.7%, 99.5%	A:100%,100% B:100%,100%	无
DFA	PathoDx 呼吸道病毒组合(Oxoid)	仅细胞培养	不能用于直接检测临床标本	A 和 B	N/A	A:100%,100% B:100%,100%	Ad, P1, P2, P3, RSV
DFA	Light 病毒深度诊断筛查(Millipore)	细胞培养	不能从 Ad, P1, P2, 或 P3 中区分流感病毒 A 或流感病毒 B	A 和 B	N/A	A: 95.8% ~ 100%, 99.6%~100% B: 100%, 100%	Ad, P1, P2, P3, RSV
DFA	Light Flu A/Flu B 病毒深度诊断(Millipore)	BAL, NPA, NPS, NS, NW, TS;细胞培养	区分流感病毒 A 与流感病毒 B	A 和 B	A: 58.8%~80%, 98.3%~98.6% B: 43.2%~50%, 98.3%~100%	A: 97.8% ~ 100%, 100% B: 100%, 100%	
DFA	Light RSV Flu A 病毒深度诊断(Millipore)	细胞培养物	区分流感病毒 A 与 RSV	A	N/A	A: 95.8% ~ 100%, 99.6%~100%	RSV
IFA	Imagen 呼吸道筛查(Thermo Fisher Scientific)	NPA;细胞培养	试剂盒不能用于鉴别不同的病毒	A 和 B	96.7%, 89.6%[b]	A:100%,100% B:100%,100%	Ad, P1, P2, P3, RSV
IFA	Light 呼吸道病毒诊断筛查 IFA(Millipore)	细胞培养	不能从 Ad, P1, P2, 或 P3 中区分流感病毒 A 或流感病毒 B	A 和 B	A: 100%, 100% B: 100%, 100%	A:100%,100% B:100%,100%	Ad, P1, P2, P3, RSV

注:[a]DFA. 直接荧光抗体;IFA. 间接荧光抗体;NA. 鼻腔吸取物;NPA. 鼻咽吸取物;NPS. 鼻咽拭子;NS. 鼻拭子;NW. 鼻洗液;TS. 咽拭子;N/A. 不可用;Ad. 腺病毒;P1. 副流感病毒 1 型;P2. 副流感病毒 2 型;P3. 副流感病毒 3 型;RSV. 呼吸道合胞病毒。[b]所有测试病毒的敏感性和特异性;无法确定每种病毒的测定参数

表 86-2 市售的基于抗原的 RIDT 试剂盒快速(≤30 min)的甲型或乙型流感病毒的检测[a,b]

检测方式	试剂盒名称(生产商)	可接受的临床样本	标本采集限制	检测时间(min)	检测复杂度[c](510K 数)
试纸法色谱免疫检测	Alere 流感 A&B (Alere)	NS	使用试剂盒中提供的拭子	10	CLIA 豁免(K092349)
试纸法色谱免疫检测	QuickVue 流感 A + B (Quidel Corporation)	NPS,NS	仅支持限定转运液	10	CLIA 豁免(K031899)
侧向流色谱免疫检测	Biosign 流感 A+B(Princeton BioMeditech Corporation);Consult Immunoassay 流感 A&B(McKesson);ImmunoCardSTAT! 流感 A&B(Meridian Bioscience, Inc.);OraSure Quick Flu 快速流感 A+B 测试(OraSure Technologies, Inc.);OSOM Ultra 流感 A&B(Sekisui Diagnostics);Status 流感 A&B(Life Sign LLC)	NS, NPS,NPA,NW	仅限试剂盒提供的拭子	10~15	CLIA 豁免(NS, NPS);中等(NPA,NW)(K083746)[d]
侧向流色谱免疫检测	Xpect 流感 A&B (Thermo Fisher Scientific)	NS, NW,TS	对拭子标本,使用铝制或者塑料柄的合成棉头(涤纶或尼龙)棉签,不推荐使用棉头和木杆;不能使用藻酸钙拭子	15	CLIA 中等(K031565)
含判读器的侧向流色谱免疫检测	Alere BinaxNOW 流感 A&B 卡片 2 (Alere)[e]	NPS, NS	使用试剂盒中包含的拭子	15	CLIA 豁免(K162642)
含判读器的侧向流色谱免疫检测	BD Veritor (Becton Dickinson)[e]	NPS, NS	—	10	CLIA 豁免(K112277)
含判读器的侧向流色谱免疫检测	BD Veritor (Becton Dickinson)[e]	NA, NW,转运液中的 NPS	—	10	CLIA 中等(K121797)
含判读器的侧向流荧光免疫检测	Sofia 流感 A+B FIA(Quidel Corporation)[e]	NPA, NPS, NS, NW	NPS 标本使用尼龙头拭子;NS 标本使用试剂盒提供的拭子	15	CLIA 豁免(K162438)

注:[a] 更多关于快速检测的信息可见网址:http://www.cdc.gov/flu/professionals/diagnosis/rapidlab.htm。[b] NA. 鼻腔吸取物;NPA. 鼻咽吸取物;NPS. 鼻咽拭子;NS. 鼻拭子;TS. 咽拭子;NW. 鼻洗液。[c] CLIA(临床实验室改进修正案):CLIA 免除实验室采用了简单和准确的方法,排除了出现错误结果的可能性。CLIA-中等复杂性检测需要在检测时具备一些知识,培训,试剂准备,处理,熟练操作,有能力解决或解释,以及判断结果。CLIA 免除的可用作 POCT 检测;有些在实验室中使用时被重新归类为中等复杂性。[d] 几个不同名称的试剂盒有相同的 510K 编号。[e] 需要一个仪器进行结果判读

场床边检测[例如,那些被临床检验改进修正案(CLIA)归为免除的试验]。不同的试剂盒检测的样品的类型不同,样品采集和处理需要遵循具体的说明,以获得最佳结果。检测的特性受临床因素的影响,包括患者年龄(成人一般敏感性较低)、临床样本的病毒含量及分析的样品类型。2009年H1N1流感大流行期间,某些情况下基于抗原检测的RIDTs识别感染的敏感性很差[31-32]。由于许多基于抗原检测的RIDTs敏感性低,导致美国FDA决定重新评估其识别流行株(信息通常来自于CDC)的能力,建议使用适当的培养或分子生物学方法为金标准,设定样本的最小敏感性要求(表86-3),为评估基于抗原检测的RIDTs在突发公共卫生事件中检测出新型流感病毒株的能力做准备[33]。结果,数种先前已经商品化的试剂盒不再适合使用,其他的试剂盒也进行了改进以增强其性能。即使有这些新要求,RIDT检测结果阴性也不应阻止疑似流感患者接受抗病毒治疗,特别是流感在社区流行时,应考虑利用培养或RT-PCR进行后续检测[19]。

表 86-3 FDA对基于抗原的RIDTs的最低性能要求(28)

	对照方法=分子检测	对照方法=培养
敏感性最低值估计		
流感病毒 A	80%	90%
流感病毒 B	80%	80%
敏感性,95%*CI* 下限		
流感病毒 A	≥70%	≥80%
流感病毒 B	≥70%	≥70%
特异性最低值估计		
流感病毒 A 和 B	95%	95%
特异性,95%*CI* 下限		
流感病毒 A 和 B	≥90%	≥90%

(三)核酸分析

分子检测方法被越来越多地用于流感病毒的检测和特征分析(见下文)。最常用的分子检测方法是逆转录(reverse transcription, RT) PCR。首先从临床样本中提取病毒核酸。利用二氧化硅颗粒结合的异硫氰酸胍或基于此方法的商品化试剂盒可以有效地去除对酶扩增有抑制作用的物质。与手动方法相比,自动提取仪器减少了在样品制备时花费的人工时间,提高检测过程的重复性,并且一些商业化的试验方法被许可与自动提取程序结合使用。使用随机六聚体或病毒基因特异的寡核苷酸,将RNA逆转录合成cDNA。利用病毒基因特异的寡核苷酸作为引物,利用热稳定的核酸聚合酶对cDNA进行扩增。采用多种不同的方法确定病毒特异性的扩增产物(例如,通过长度识别、杂交、限制性酶切图谱、测序)。

自最早1991年用RT-PCR方法检测并区分A、B和C型流感病毒以来,目前已发展出大量不同的RT-PCR检测方法[34]。识别和区分不同型别流感病毒的方法是针对其保守基因,如基质基因,而亚型特异性检测方法是扩增部分HA基因(表86-4)。嵌套的巢式PCR方法可以提高检测敏感性,但很难避免其带来的污染问题,因而限制了大多数诊断实验室使用该方法。实时荧光定量RT-PCR方法不易受到交叉污染,可直接快速检测临床标本中的流感病毒,敏感性接近或超过培养方法[35]。目前已有能够识别流感病毒和其他呼吸道病毒的多重检测方法,其检测能力达到或超过细胞培养方法[36-37]。可以用多种方法来检测扩增产物,根据每种方法的特点使用不同的设备。多重呼吸道病毒检测方法可能比针对单一病毒的单重检测方法敏感性低[36-37]。近年来发现,在针对H3N2病毒的某些方法中,循环病毒之间的遗传漂移会导致引物和探针靶区域发生突变,从而导致测定敏感性降低[38]。鉴于此类检测的可及性、具有FDA的批件、可鉴定多种呼吸道病原体(表86-4)等特点,许多诊断实验室使用这些方法诊断呼吸道病毒感染,并取代了更耗时的细胞培养方法。具有更高敏感性的分子检测技术正取代培养的方法成为流感病毒检测的金标准[36-37,39]。

表 86-4 FDA 核准的其他流感病毒的分子检测方法[a,b]

检测方式	试剂盒名称（生产商）	仪器设备	可接受的临床样本	可检测的病毒型别、亚型	流感目的基因	检测时间（min）	检测复杂度（510K 数）	可检测的其他病毒	参考文献
恒温核酸扩增试验-缺口酶扩增反应（NEAR）	Alere i 流感 A&B；Alere i 流感 A&B 2（Alere）	Alere i	NPS，NS；直接或在 VTM 中	A，B	PB2（A）；PA(B)	<15	CLIA 豁免（K141520，K171792）；中等（K163266，K111387）	无	42，78
恒温核酸扩增-逆转录解旋酶依赖性扩增（RT-HDA）	Solana 流感 A＋B 检测（Quidel Corporation）	Solana Instrument	NPS，NS	A，B	Matrix（A，B）	约 45	Moderate（K161814）	无	79
多重实时 RT-PCR	cobas Liat 流感 A/B（Roche Molecular Diagnostics）	cobas Liat system	NPS	A，B	Matrix（A）；NSP（B）	约 20	CLIA 豁免(K111387)	无	78
多重实时 RT-PCR	cobas Liat 流感 A/B & RSV（Roche Molecular Diagnostics）	cobas Liat system	NPS	A，B	Matrix（A）；NSP（B）	约 20	CLIA 豁免(K153544)	RSV	80
多重实时 RT-PCR	Panther Fusion 流感 A/B/RSV（Hologic，Inc.）	cobas Liat system	NPS	A，B	Matrix（A，B）	约 150	高(K171963)	RSV	81
实时 RT-PCR	CDC 人流感病毒实时 RT-PCR 检测和分析组合(CDC)	ABI 7500Fast DX RealTime PCR instrument	BAL，BW，NA，NPS，NS，NW，TA，TS，痰，肺	A（H1，H3，2009 H1，H5），B［Yamagata 系（B/Yam），Victoria（B/Vic）系］	Matrix(A)；NP（A/swine）；NSP（B）；HA（H1，H3，2009H1，H5，B/Yam，B/Vic）	约 240	高(K132508)	无	82
实时 RT-PCR	Joint 生物试剂鉴定诊断系统(JBAIDS)流感 A&B(U.S Army)	JBAIDS instrument	VTM 中的 NPS，NW	A，B	Matrix（A）；NSP（B）	约 240	高(K111775)	无	83
实时 RT-PCR	JBAIDS 流感 A/H5（Asian 系）检测试剂盒(U.S. Army)	JBAIDS instrument	VTM 中的 TS，NPS	A/H5	HA（H5，Asian lineage）	约 240	高(K100287)	无	无
实时 RT-PCR	JBAIDS 流感 A 亚型试剂盒（U.S. Army）	JBAIDS instrument	VTM 中的 NPS，NW	A/H1，A/2009 H1，A/H3，A/swine	HA（H1，2009 H1，H3）；NP（A/swine）	约 240	高(K111778)	无	83

（续 表）

检测方式	试剂盒名称（生产商）	仪器设备	可接受的临床样本	可检测的病毒型别、亚型	流感目的基因	检测时间（min）	检测复杂度（510K 数）	可检测的其他病毒	参考文献
比色可视化多重 RT-PCR	Accula 流感 A/B 测试（Mesa Biotech, Inc.）	Accula Dock instrument	NS	A,B	PB2 (A), Matrix (B)	约 30	CLIA 豁免（K171641）	无	无
多重 RT-PCR	artus 流感 A/B RG 试剂盒（Qiagen GmbH）	Rotor-Gene Q MDx	VTM 中的 NPS	A,B	Matrix (A, B)	约 240	高（K113323）	无	84
多重实时 RT-PCR	Cepheid Xpert Flu 鉴定	Cepheid GeneXpert Instrument Systems	VTM 中的 NW, NA, NPS,	A,B	Matrix (A); HA (2009 H1); ? for B	75	中等（K123191）	无	85,86
多重实时 RT-PCR	Cepheid Xpert Flu/RSV XC 鉴定	Cepheid GeneXpert Instrument Systems	VTM 中的 NW, NA, NPS,	A,B	Matrix (A, B), PB2 (A); PA (A); NSP (B)	60	CLIA 豁免，中等（K142045）	RSV	87
多重实时 RT-PCR	Cepheid Xpert Xpress Flu 鉴定	Cepheid GeneXpert Instrument Systems	VTM 中的 NPS	A,B	Matrix (A, B), PB2 (A); PA (A); NSP (B)	约 30	CLIA 豁免（K171552），中等（K162456）	无	无
多重实时 RT-PCR	Cepheid Xpert Xpress Flu/RSV 鉴定	Cepheid GeneXpert Instrument Systems	VTM 中的 NPS	A,B	Matrix (A, B), PB2 (A); PA (A); NSP (B)	约 30	中等（K162331）	RSV	88,89
多重 RT-PCR 利用伏安法检测探针	ePlex 呼吸道病毒组合（GenMark Diagnostics, Inc.）	ePlex Instrument	VTM 中的 NPS	A (H1, 2009 H1, H3), B	Matrix (A); PB1 (B); HA (H1, H3, 2009 H1)	约 105	中等（K163636）	RSVA, RSVB, PIV1, PIV2, PIV3, PIV4, hMPV, Ad, HRV/Ent, CoV	90
多重 RT-PCR 利用伏安法检测探针	eSensor 呼吸道病毒组合（GenMark Diagnostics, Inc.）	eSensor XT-8TM System	VTM 中的 NPS	A (H1, 2009 H1, H3), B	Matrix (A); PB1 (B); HA (H1, H3, 2009 H1)	约 480	高（K113731）	RSVA, RSVB, PIV1, PIV2, PIV3, hMPV, Ad, HRV/Ent	39,91
多重 RT-PCR 利用终点溶解曲线分析	FilmArray 呼吸道组合（BioFire Diagnostics）	FilmArray Instrument, FilmArray System 2.0 or FilmArray Torch System	VTM 中的 NPS	A (H1, 2009 H1, H3), B	Matrix (A); HA (H1, 2009 H1, H3, B)	约 60	中等（K110764, K160068）	RSV, PIV1, PIV2, PIV3, PIV4, hMPV, HRV/Ent, Ad, OC43, HKU1, 229E, NL63	39,90

（续 表）

检测方式	试剂盒名称（生产商）	仪器设备	可接受的临床样本	可检测的病毒型别、亚型	流感目的基因	检测时间(min)	检测复杂度(510K 数)	可检测的其他病毒	参考文献
多重 RT-PCR 利用终点溶解曲线分析	FilmArray 呼吸道组合 2.0（BioFire Diagnostics）	FilmArray System 2.0 or FilmArray Torch System	VTM 中的 NPS	A（H1，2009 H1，H3），B	Matrix（A）；HA（H1，2009 H1，H3，B）	约 45	中等(K170604)	RSV，PIV1，PIV2，PIV3，PIV4，hMPV，HRV/Ent，Ad，OC43，HKU1，229E，NL63	92
多重 RT-PCR 利用终点溶解曲线分析	FilmArray 呼吸道组合 EZ (BioFire Diagnostics)	FilmArray Instrument	VTM 中的 NPS	A（H1，2009 H1，H3），B	Matrix（A）；HA（H1，2009 H1，H3，B）	约 60	CLIA 豁免（K152579）	RSV，PIV^{c}，hMPV，HRV/ Ent，Ad，CoV^{c}	无
多重 RT-PCR 利用电喷雾电离质谱(ESI-MS)	PLEX-ID Flu（Abbott Laboratories）	PLEX-ID system	NPS	A (H1，H3)，B	PB1，NP（A），Matrix（A），PA（A），PB（A），PB2（B），NS1（A），HA（2009 H1），NA（2009 H1）	约 480	高(K121003)	无	93
多重实时 RT-PCR	ProFast＋检测（Hologic，Inc.）	Cepheid Smart Cycler Ⅱ	VTM 中的 NPS	A（2009 H1，seasonal H1，H3）	HA	约 240	高（K101855）	无	93，94
多重实时 RT-PCR	ProFlu＋检测（Hologic，Inc.）	Cepheid Smart Cycler Ⅱ	VTM 中的 NPS	A，B	Matrix（A），NSP (B)	约 240	高（K110968，K132129，K153219）	RSV	88，94
多重 RT-PCR	Lyra 流感 A＋B (Quidel)	ABI 7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument，QuantStudio Dx Real-Time PCR Instrument，Cepheid Smart Cycler Ⅱ	VTM 中的 NPS，NS	A，B	Matrix（A），NSP (B)	<75	中等（K112172，K113777，K131728）	无	无
多重实时 RT-PCR	Simplexa Flu A/B & RSV (Focus Diagnostics)	3M Integrated Cycler	VTM 中的 NPS	A，B	Matrix (A，B)	<240	高（K102170）	RSV	95，96
多重实时 RT-PCR	Simplexa Flu A/B & RSV Direct（Focus Diagnostics)	3M Integrated Cycler	VTM 中的 NPS	A，B	Matrix (A，B)	约 60	中等（K120413）	RSV	97

（续 表）

检测方式	试剂盒名称（生产商）	仪器设备	可接受的临床样本	可检测的病毒型别、亚型	流感目的基因	检测时间（min）	检测复杂度（510K 数）	可检测的其他病毒	参考文献
多重实时 RT-PCR	Simplexa 流感病毒 A H1N1（2009）试剂盒（Focus Diagnostics）	3M Integrated Cycler	VTM 中的 NS，NPA，NPS	A（2009 H1）	Matrix（A），HA（2009 H1）	<240	高（K100148）	无	98
多重实时 RT-PCR 用溶解曲线分析	ARIES Flu A/B & RSV 检测（Luminex Corporation）	ARIES System，ARIES M1 System	VTM 中的 NPS	A，B	Matrix（A，B）	<120	中等（K161220）	RSV	87
多重实时 RT-PCR，靶标特异性引物延伸，流控微珠芯片	xTAG 呼吸道病毒组合（Luminex Molecular Diagnostics）	Thermal cycler plus Luminex 100 or 200 system	VTM 中的 NPS	A（H1，H3），B	Matrix（A），HA（H1，H3，B）	约 450	高（K063765，K112199）	RSV A，RSV B，PIV1，PIV2，PIV3，hMPV，HRV，Ad	36，39
多重实时 RT-PCR，靶标特异性引物延伸，流控微珠芯片	xTAG 呼吸道病毒组合（Luminex Molecular Diagnostics）	Thermal cycler plus Luminex 100 or 200 system	VTM 中的 NPS	A（H1，H3），B	Matrix（A），HA（H1，H3，B）	约 360	高（K103776）	RSV，hMPV，HRV，Ad	96
多重实时 RT-PCR，靶标特异性引物延伸，流控微珠芯片	NxTAG 呼吸道病毒组合（Luminex Molecular Diagnostics）	MAGPIX instrument	VTM 中的 NPS	A（seasonal H1，H3），B	Matrix（A，B），HA（H1，H3）	约 225	高（K152386）	RSV A，RSV B，PIV1，PIV2，PIV3，PIV4，hMPV，HRV，Ad，OC43，229E，NL63，HKU1，Boca	99
多重实时 RT-PCR 用微阵列杂交	Verigene 呼吸道病原体 Flex 核酸检测（Luminex Corporation）	Verigene System	VTM 中的 NPS	A（H1，H3，2009 H1），B	Matrix（A），HA（2009 H1，H3），NSP（B）	约 120	中等（K143653）	RSV A，RSV B，PIV1，PIV2，PIV3，PIV4，hMPV，HRV，Ad	100

注：[a] 关于快速检测更多的信息可见网址：http://www.cdc.gov/flu/professionals/diagnosis/molecular-assays.htm。[b] BAL. 肺泡灌洗液；NA. 鼻腔吸取物；NPS. 鼻咽拭子；NS. 鼻拭子；TS. 咽拭子；BW. 支气管洗液；NW. 鼻洗液；TA. 气管吸取物；VTM. 病毒转运液；NP. 核蛋白；RSV. 呼吸道合胞病毒；PIV. 副流感病毒；hMPV. 人偏肺病毒；HRV. 人鼻病毒；Ent. 肠道病毒；Ad. 腺病毒；Boca. 博卡病毒；OC43，229E，NL63，HKU1. 人冠状病毒（CoV）变异株；HA. 血凝素；NSP. 非结构蛋白；？. 未见报道。[c] 不区分类型

目前正在评估用于直接检测临床样本中的流感病毒的一系列等温分子扩增方法，包括核酸序列为基础的扩增(nucleic acid sequence-based amplification，NASBA)、逆转录-环介导的扩增(reverse-transcription-loop mediated amplification，RT-LAMP)、RT-解旋酶-依赖性扩增(RT-helicase dependant amplification，RT-HDA)及RT缺口酶扩增反应(RT-nicking enzyme amplification reaction，RT-NEAR)[40-41]。核酸扩增发生在一个单一的温度，而不需要PCR相关的循环。所有这些检测都需要先使用逆转录酶来合成互补的DNA。NASBA利用T7 RNA聚合酶产生RNA扩增子，而其他此处列出的方法是使用DNA聚合酶产生DNA扩增子。基于DNA的方法，其双链DNA的解链是利用酶的作用，而不是PCR反应中使用的热变性的结果。可用各种不同的检测方法来检测有效扩增，包括分子信标探针、浊度检测(RT-LAMP)及利用电化学检测仪进行探针杂交。如同RT-PCR方法，在诊断流感病毒感染方面，这些等温扩增方法的敏感性高于培养或免疫荧光抗体染色方法。

分子检测的结果时间因所使用的方法而不同，有的可能会超过4 h(表86-4)。但是，某些检测可在30 min内得出结果，并且还有几种CLIA豁免的检测可用(表86-4)。与快速抗原检测获得的结果相比，这些方法具有更高的敏感性，并且可以实现床旁快速检测(point-of care test，POCT)，从而改善了门诊患者的诊疗[32,42]。

七、分离程序

流感病毒分离应在生物安全2级(biosafety level 2，BSL-2)条件下进行。当临床样本可能来自疑似高致病性禽流感(highly pathogenic avian influenza，HPAI)病毒或其他可能导致人类严重疾病的A型禽流感病毒，病毒分离应在BSL-3或更高的条件下进行[43]。人类临床标本应在单独的实验室中进行处理，并由不接触猪或禽类临床材料的工作人员来操作[44]。

(一)细胞培养

流感病毒可在许多不同的细胞系生长，包括原猴肾细胞、Vero细胞、人肺二倍体成纤维细胞、貂肺上皮细胞、人肺腺癌(A549)细胞和犬肾传代细胞(Madin-Darby canine kidney，MDCK)[41,45-46]。虽然存在一些季节性变异，MDCK和原猴肾细胞系对流感病毒具有相似的分离率[45]，并且MDCK细胞比Vero或二倍体肺成纤维细胞更敏感[46]。因此，MDCK细胞(CCL34；美国典型培养物保藏，马纳萨斯，VA)这种连续极化的细胞系，是用于流感病毒分离最常见的细胞株，可促进A、B和C型流感病毒的生长。连续传代的细胞系不产生切割病毒HA的蛋白酶，而这是产生感染性子代病毒的必需步骤，所以培养基中必须添加外源性蛋白酶。经L(对甲苯磺酰氨基，Tosylamido-2-phenyl)乙基氯甲基酮[L-(Tosylamido-2-phenyl)ethyl chloromethyl ketone，TPCK]处理的、浓度1～2 μg/ml的胰蛋白酶可提供所需的蛋白水解酶活性，是推荐的用于病毒分离的蛋白酶。胰凝乳蛋白酶可在血凝素裂解过程中，抑制胰蛋白酶介导的病毒感染性的增强，而TPCK处理可以抑制胰凝乳蛋白酶活性。

MDCK细胞在含有5%～10%胎牛血清(Fetal calf serum，FCS)的生长液中复制。FCS含有抑制因子，会阻止感染性病毒的产生，所以临床标本接种之前必须去除FCS[47-48]。可使用Hanks缓冲液或无血清培养基来洗涤细胞片，充分去除含有蛋白质的生长培养基，去除FCS的抑制作用，然后加入无血清培养基覆盖细胞片。把临床样本接种于培养基。孵育2 h后，去除接种混合液，加入含有TPCK处理过的胰蛋白酶的无血清培养基。另外，样品也可直接接种到细胞，加入含有TPCK处理的胰蛋白酶的无血清培养基，孵育过夜，次日换液。在33～34℃进行培养并监测病毒的生长。

流感病毒的复制通常会产生细胞病变效应(cytopathic effects，CPE)，在接种1周内会导致细胞层的破坏。病毒复制时，可能有CPE也可能没有，可以利用病毒HA结合不同动物红细胞的唾液酸残基来判定病毒的复制。应该每2或3天对培养物进行检测，可以用红细胞吸附(病毒感染细胞的HA结合红细胞)或血凝(在培养基中的病毒将红细胞交联)来检测病毒复制。为检测在组织培养管中的吸附现象，首先观察细胞单层的CPE(图86-1a)，将培养基去除并保存。用1 ml的0.05%豚鼠红细胞冲洗细胞片3次。然后加入1 ml 0.5%豚鼠红细胞，红细胞悬液覆盖细胞层，将培养管在

4℃放置 20 min。摇动培养管，利用显微镜观察细胞层上吸附的红细胞（图 86-1b）。如果细胞病变得分小于 4+（即，<75%的细胞发生了 CPE），用磷酸缓冲液润洗组织培养管，然后再次加入培养基。最初从发生 4+细胞病变管收集的培养液可用于进一步的检测分析。整个上述过程都是在 BSL-2 生物安全柜中进行，必须注意防止不同培养物之间的交叉污染。豚鼠红细胞检测流感病毒的敏感性比禽类细胞高，但 C 型流感病毒不凝集豚鼠红细胞。鸡红细胞可用于 C 型流感病毒的血凝检测。虽然大多数分离株在接种后 1 周内就会生长，病毒含量低的标本可能需要延长培养时间至 10～14 天，或者进一步盲传阴性培养物。对可能的分离培养物开展进一步分析，如下所述。

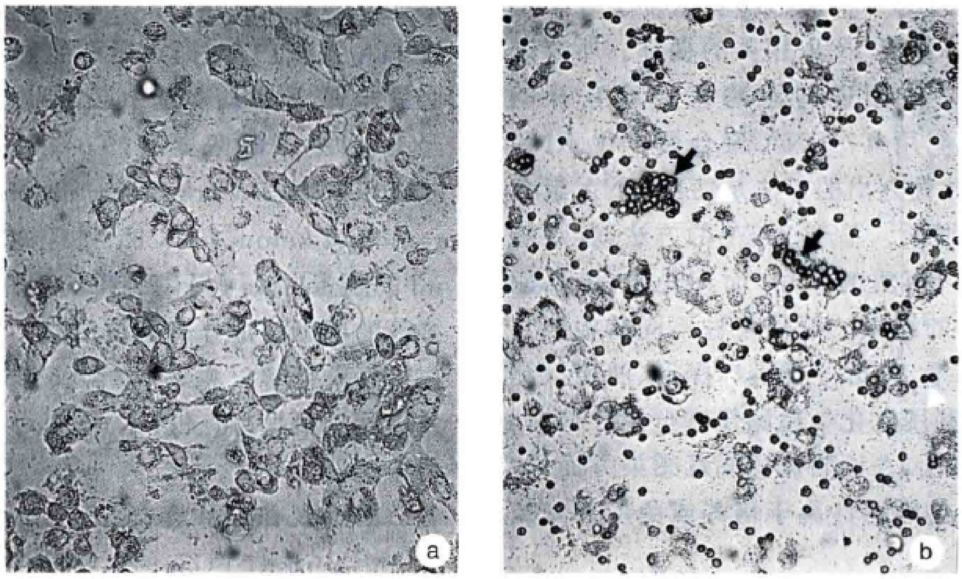


图 86-1 流感病毒感染的 MDCK 细胞

注：a. 细胞病变；b. 豚鼠红细胞吸附试验。病毒感染的细胞表面可见红细胞附着（黑色箭头），感染的细胞破裂后残留的血凝素同样可吸附红细胞（白色箭头）

传统的细胞培养方法的缺点是需要较长时间才能得到阳性结果（平均 4～5 天）。更快速的方法是接种到置于小瓶或多孔板的细胞单层。这种方法可以使用传统用于流感病毒培养鉴定的细胞系（例如，MDCK 细胞）或混合细胞培养（例如，A549 细胞加貂肺细胞）来筛选多种呼吸道病毒（R-Mix FreshCells；Quidel，San Diego，CA），可以检测季节性流感病毒及含有新型血凝素的流感病毒[31,49]。在 24～72h 后固定细胞，利用型特异性单克隆抗体来检测病毒抗原。虽然文献报道，R-mix 细胞检测 A 型和 B 型流感的敏感性 82%～100%，但敏感性可能低于常规的病毒分离方法[31,49]。小瓶法的不足之处是不能获得病毒开展进一步检测（例如，抗原特征）。在常规培养 10～14 天之后，弃去细胞之前，可以用免疫荧光的方法筛查病毒抗原[50]。如果用血球吸附或血凝检测时，这一步通常不是必须的，不过在无细胞病变时，如果不用其他病毒检测方法，这种免疫荧光方法可以检测病毒抗原。

（二）从鸡胚分离病毒

将临床样本接种 10～11 日龄的鸡胚羊膜腔和尿囊腔来分离 A 型和 B 型流感病毒。C 型流感病毒用 7～8 日龄的鸡胚进行分离，不过这些病毒也可使用 10～11 日龄的鸡胚分离获得。鸡胚有内源性蛋白酶，能够切割病毒血凝素使病毒获得感染性，因此没有必要加入外源蛋白酶。鸡胚接种后在 33～34℃培养 2～3 天（C 型流感病毒培养 5 天），然后收集羊水和尿囊液并测定血凝活性。A 型和 B 型流感病毒可以在尿囊腔和羊膜腔贴附的细胞中生长，而 C 型流感病毒只能在鸡胚羊膜腔贴附的细胞中生长。如果没有检测到流感病毒的血凝活性，通过 1～2 次盲传也可能分离到病毒。盲传时将相同量的羊水和尿囊液接种到鸡胚，如前所述[47]。

鸡胚中流感病毒的分离和传代可导致适应性

突变，包括病毒血凝素中糖基化位点的改变[51-52]。此类改变可能会对疫苗中使用的鸡胚传代病毒的免疫原性产生不利影响，从而导致疫苗效力下降，正如所观察到的针对 A/H3N2 病毒的鸡胚传代灭活流感疫苗一样[52]。

八、鉴定和分离系统

用来鉴定和分析流感病毒株的方法有多种。最常见的是免疫学或分子生物学方法（表 86-5）。第一步是识别出流感病毒，以区别于其他能凝集或吸附红细胞的呼吸道病毒（例如，副流感病毒、腮腺炎病毒）。在许多情况下，利用市售的靶向病毒 NP 蛋白和 M 蛋白的型特异性抗体，采用免疫荧光或免疫组化染色或酶联免疫吸附测定法（enzyme-linked immunosorbent assay，ELISA），就可以完成病毒的型别鉴定。当进行细胞培养分离时，这些检测尤为有用。在表 86-2 中列出的快速免疫层析试剂可以确定病毒的型别，但这些方法用于分离培养物测定的相关数据有限，尚未获批准用于这方面检测。重要的是，当细胞培养收获的病毒量较低时，免疫层析检测也可能出现假阴性结果。

表 86-5　流感病毒分离株的鉴定和分析方法

方法	优势	局限性
利用型或亚型特异性血清的方法		
ELISA	标准检测方法，性能特点已知；多数实验室熟悉其检测形式	进行流感病毒 A 亚型检测时，需要定期更新血清来检测流行株
血凝抑制试验	标准检测方法，性能特点已知；不需要特殊仪器；抗原分析的金标准	进行流感病毒 A 亚型检测时，需要定期更新血清来检测流行株；许多临床实验室对此方法缺乏经验
对感染细胞进行免疫荧光或免疫过氧化物酶染色	标准检测方法，性能特点已知；多数实验室熟悉其检测形式；有商业化单克隆抗体	进行流感病毒 A 亚型检测时，需要定期更新单克隆抗体来检测流行株
分子方法		
RT-PCR	非常灵敏的检测方法	有可能带来污染需要严格的实验室管理控制
扩增片段大小	操作简单	非特异扩增会导致假阳性
探针杂交	最常用的 PCR 结果确认方法；实时检测，不需随后的扩增过程	依据使用的杂交方法，可能会增加检测时间
限制性分析	操作简单	需要已知特定序列；需要特异性核酸酶切位点；增加 PCR 后标本的处理
基因测序	最高等级鉴定方法；基因数据可以用于其他研究	需要特殊仪器；技术复杂；费用增加
微阵列分析	可具备同时分析多基因序列的潜力	仍在探索中，经验有限

血凝抑制试验（hemagglutination inhibition，HAI）已经使用了 75 年以上，目前仍用于流感病毒的鉴定[44,53]。HAI 分析可以鉴定型别、亚型或株特异性，尤其可用于检测同一亚型内不同毒株之间的抗原关系。HAI 是 WHO 流感毒株抗原分析与疫苗株选择的金标准。通常用雪貂、羊或鸡制备免疫血清。对病毒的血凝活性进行定量，将标准量的病毒 HA（4 HA 单位）与 2 倍系列倍比稀释的免疫血清混合，再与火鸡或豚鼠红细胞混合。与参考株之间的 HAI 血凝活性存在 4 倍或更大的差异时，提示该分离株可能是一个抗原变异株。因为 HA 随时间会发生抗原改变，必须定期准备和标化针对流行间期毒株的亚型特异性抗血清。因此，HAI 检测通常是作为一种监测活动，或者在流行病学强烈提示疑似感染了非人流感毒株时进行检测。

分子检测方法可用于病毒鉴定和分析。检测临床标本中的病毒和病毒分离株可用相同的 RT-PCR 方法。分子检测优于免疫学检测的方面为即使抗原发生显著变异，分子检测也可以鉴定出流感病毒亚型，因为 *HA* 基因有非常保守的区域，可作为引物和探针识别的目标。可用多重检测来区分 A 型和 B 型流感病毒，或鉴定不同的 HA 和 NA 亚型[54]。通过确定扩增片段大小或利用型别

或亚型特异性探针进行杂交可以判断结果，也可对扩增产物直接测序。如果不同变异株的序列是已知的，鉴定时可以用限制性内切酶消化扩增的DNA，产生每个毒株特异的限制性片段长度多态性（restriction fragment length polymorphisms，RFLP）。例如，这种方法被用来区分在同一个季节流行的2株H3N2变异株[55]。A/武汉/359/95（H3N2）样病毒变异株的扩增产物，能被限制性内切酶BstF5I酶切消化，而A/悉尼/05/97（H3N2）样病毒变异株的扩增产物可以经HindⅢ酶切消化。由于RFLP在设计分析方面存在难度，而DNA测序的成本和时间已经降低，因此对扩增产物或整个HA基因直接测序已经成为追踪和分析特定毒株更为常见的方式。电喷雾/电离质谱也可以用来分析病毒特异性PCR扩增产物，可在病毒基因组序列未知时，鉴定新的变异和重配病毒，当时，2009 H1N1病毒就是这样被鉴定为可能是一个猪源性病毒[56]。

DNA微阵列技术被越来越多地用于诊断特定病原体。在芯片或膜上放上寡核苷酸探针阵列，然后检测病毒特异性序列的杂交。可以通过病毒基因组RNA合成的cDNA，或通过RT-PCR扩增基因组RNA来获得病毒序列。微阵列分析已经可以用来区分流感病毒型别（A与B）和亚型[57-58]。但目前它们的成本对大多数个人独立实验室来说都过高。

下一代测序技术已应用于流感以分析整个流感的基因组[59-60]。该技术可以确定每个片段的序列，从而更详细地评估病毒基因的重组和进化。这项技术有望在监测研究中更全面地描绘病毒株。

九、血清学试验

流感病毒感染也用血清学方法检测。大多数人既往感染过流感病毒，因此，检测病毒特异性免疫球蛋白M（immunoglobulin M，IgM）或其他的免疫球蛋白亚类不是特别有用[61]。除非用来检测IgM对禽流感病毒的新型HA的反应[62]。需要采集间隔至少10天的急性期和恢复血清，来检测血清抗体水平的显著升高（4倍或更高）。在检测急性发病患者时，配对血清检测无法实现。相反，血清学检查主要用于监测和流行病学研究。最广泛使用的检测包括补体结合、HAI、中和实验、酶免疫分析法。补体结合识别针对NP的型特异性抗体，但在检测显著升高的抗体水平时，不如其他常用的血清学试验方法敏感。HAI和血清中和抗体检测的重要意义在于，较高的血清抗体的水平与其对感染和疾病的保护水平显著相关，而抗体水平可用于确定感染及对疫苗的应答水平。HAI抗体阻止病毒的HA与红细胞的唾液酸残基结合，从而抑制血凝。HAI检测中的每一个组成部分都会影响检测的结果。人和动物血清中可能含有非特异性血凝抑制因素，不过已经有方法来去除这些抑制因素[47]。病毒抗原的来源可以影响检测结果，在细胞培养中分离的病毒比鸡胚培养的病毒更容易检测到抗体的升高[63]。红细胞的来源可以影响检测结果。鸡和火鸡红细胞通常用于检测针对人流感病毒的HAI抗体，但它们可能无法检测针对禽流感（如H5N1）的HAI抗体。用马的红细胞作为替代，可以提高用于检测禽流感病毒抗体的HAI试剂的敏感性[64]。中和抗体阻断病毒感染，是更为敏感的流感病毒抗体检测方法[65]。中和试验是检测高致病性禽流感（HPAI）抗体的首选方法[66]。已经开发出共识方法，允许不同实验室之间的结果进行比较[67]。因为这些方法需要使用活病毒，实验使用HPAI病毒仅限在具有BSL-3或更高级别的实验室。酶免疫测定也用于检测针对全病毒抗原或特异性病毒蛋白的抗体反应。结合物和用于检测的抗原是影响结果的因素（敏感性和特异性）。酶免疫测定法用于检测各种临床标本中的特异性免疫球蛋白反应（血清样本和呼吸道分泌物）。针对流感的血清学试验法并未指导临床上每个患者的治疗，但此类检测法可用于疫苗评估及流行病学和其他方面的研究。

十、抗病毒药物敏感性

空斑抑制试验是检测对金刚烷胺和金刚乙胺药敏的金标准，但方法繁琐而且费时。ELISA方法也被用来测量在这些药物的存在下，病毒抗原表达的减少情况。这些检测方法可以与*M2*基因的基因型特征相结合来分析，因为*M2*基因突变与体外和体内对这些药物的耐药性相关联[68]。RT-PCR扩增后进行限制性片段长度多态性分析或直接对扩增产物测序是识别病毒耐药的方

法[69]。对 A 型流感病毒 M2 基因扩增后进行焦磷酸测序是一种快速、高通量的方法，可以快速可靠地识别金刚烷类药物（金刚烷胺和金刚乙胺）的突变[70]。

细胞培养实验不能准确地确定对神经氨酸酶抑制剂扎那米韦和奥司他韦的敏感性。取而代之的是使用荧光或者化学底物的神经氨酸酶抑制实验来检测耐药性[71]。市售的诊断试验（例如，Applied Biosystems 公司的 NA-Star，NA-Fluor 和 NA-XTD）可用于流感病毒分离株的体外筛查[72]。这些检测的结果也与通过测序确定的 NA 基因突变相关[73]。分子检测方法可用于识别已知的与神经氨酸酶抑制剂耐药相关的 *NA* 基因突变（例如，A 型（H3N2）的 E119V 和 R292K，A 型（H1N1）的 H274Y，在 B 型流感的 R152K 突变）[74]。传统的双脱氧末端（Sanger）测序和焦磷酸测序已成功地用于识别这些 *NA* 基因突变。另一个快速筛选大量的毒株的策略是实时 RT-PCR 检测，利用探针识别野生型（敏感）的 NA 序列。这种方法可以鉴定出所有发生 *NA* 基因 H274Y 突变的 A 型（H1N1）病毒[75]。

HA 基因突变也可能导致耐药表型，这是通过降低 HA 与细胞结合的亲和力，降低了病毒从感染细胞释放出芽时对 NA 的依赖性实现的。目前没有可靠的识别血凝素（HA）耐药性突变的细胞培养系统，所以依赖于对 *HA* 基因受体结合位点的测序。

十一、结果的评价、解释和报告

必须从整体上来考虑诊断实验的结果。临床医生在评估测试结果的合理性上起着至关重要的作用，但实验室也有助于结果评估。除了使用的检测类型、季节性外，流行病学和临床因素也是需要考虑的方面。实验室和临床医生都可能发现意想不到的实验室结果。例如，当不存在流感社区流行时，检测到流感阳性，应及时评估是否流行（如旅行史）或临床（如免疫缺陷宿主）因素支持流感病毒感染的诊断。同样，对具有流感症状和体征的患者，阴性检测结果，特别是敏感性较低的检测（如 RIDT），不应排除对有上述患者进行抗病毒治疗。实验室和临床医生之间的密切合作是质量控制程序的重要组成部分。

没有诊断方法具有 100%的敏感性和特异性，所以假阳性和假阴性结果预期是会发生的，有许多因素会降低敏感性和特异性，需要在正在使用的质量控制方案中评估。假阴性结果可能是由于临床样品采集质量差或不恰当、样品运输和处理延迟、样本保存不当（如错误的温度或运输条件）、临床进程中样本的采集时机（如晚于推荐的时间，病毒排出已经减少）、诊断分析方法本身的性能特点（如低敏感性），以及感染毒株（如猪或禽流感）等。假阳性结果可能是由于诊断试验的其他特性（如非特异性反应），以及实验室内的交叉污染、样本贴错了标签、微生物污染等。在收集、运送和处理临床标本时应建立并遵循标准操作程序，将检测结果不准确的可能性降低到最小。试剂应标准化，并定期利用阳性和阴性质控品来评估检测性能。根据检测的类型和数量，以及试剂的来源确定评估的时间。

每个实验室在选择诊断方法时，必须确定其流感病毒诊断程序的目标。快速和敏感的检测，可以有助于对患者的处置，能够有针对性开展抗病毒治疗及采用适当的感染控制隔离程序。阳性检测结果可以为密切接触者的预防性治疗提供依据，尤其是对高危人群。在医院内暴发时，当在流感季节开始时（流感之前被确认为在社区内流行），以及对有猪或禽类接触史或者流感流行地旅行史的人，早期和快速的实验室诊断对评估流感样病例很重要。猪源或禽源病毒株的确认可以通过将可疑样品或分离株提交给公共卫生实验室进行评估来完成。实验室的经验、人员配备，以及可用的设备也会影响检测方法的选择。例如，进行免疫荧光检测需要荧光显微镜和有经验的技术人员，RT-PCR 检测需要热循环仪及其他设备。如果临床标本来自可能感染了高致病性禽流感（HPAI）病毒（如 H5N1）的患者，目前对未达到病毒培养所需的 BSL-3 或更高条件的实验室推荐采用非培养的方法进行检测[43]。可以在 BSL-2 实验室利用商业化的抗原检测方法或更敏感的 H5 和 H7 特异的 RT-PCR 方法检测。在美国，A 型流感病毒阳性标本满足临床表现[发热（>38℃）相关呼吸道症状（咳嗽、咽痛或呼吸困难）]和流行病学（接触家禽或国内鸟类，接触受禽流感影响国家的确诊或疑似 H5N1 或 H7N9 病例），疑似禽流感病毒感染时，需要将标本转送到美国 CDC 进行

进一步的评估。也可以选取部分阴性样本送到CDC进行检测，并与当地公共卫生部门进行协商[39]。

在新流感毒株出现时，已有的方法对这些毒株的敏感性可能会改变。例如，细胞系可能对新毒株的敏感性降低，或检测组织培养细胞中的流感病毒抗原（如通过血球吸附）的能力会降低[50]。因此，谨慎的做法是定期重新评估检测方法，特别是当检测结果与临床和流行病学预期不匹配时。

除了用于病例诊断，流感诊断也用于其他方面。在局部地区，当流感在社区传播时，根据临床症状做出的流感诊断（发热相关呼吸道疾病伴有咳嗽）与许多快速抗原检测的敏感性（60%～80%）相似[76]。对国家和全球监测系统分离的流感病毒进行抗原特性和基因特性分析，来识别变异病毒。这些监测数据用于每年更新的三价流感疫苗的筛选。监测以及对毒株的特性分析也会识别出新的亚型，如发生在东南亚的A型（H5N1）和A型（H7N9），以及荷兰的A型（H7N7）病毒[77]。

参考文献请扫二维码查阅

第87章　副流感病毒和腮腺炎病毒

RYAN F. RELICH, DIANE S. LELAND

（王一民　译；曹彬　审校）

一、分类

人副流感病毒（parainfluenza virus，HPIVs）和腮腺炎病毒（mumps virus）是单股负链 RNA 病毒目（*Mononegavirales*），副黏病毒科（*Paramyxoviridae*）家族成员，分属呼吸道病毒属（*Respirovirus*）和腮腺炎病毒属（*Rubulavirus*）。其中，HPIV-1 和 HPIV-3 属于呼吸道病毒属，命名为人呼吸道病毒 1 型（*Human respirovirus* 1）和人呼吸道病毒 3 型（*Human respirovirus* 3），HPIV-2、HPIV-4 和腮腺炎病毒属于腮腺炎病毒属，分别命名为人腮腺炎病毒 2 型（*Human rubulavirus* 2）、人腮腺炎病毒 4 型（*Human rubulavirus* 4）和流行性腮腺炎病毒（*Mumps rubulavirus*）。详细的分类与修订版本可以参考表 87-1。其他能导致人类感染的副黏病毒还包括亨尼病毒属[亨德拉（Hendra）和尼帕（Nipah）病毒]和麻疹病毒属（麻疹病毒）。曾经被归类为副黏病毒的呼吸道合胞病毒（respiratory syncytial virus，RSV）和人偏肺病毒（human metapneumovirus），近来已经被划分到单股负链 RNA 病毒目的一个新的科-肺泡病毒科中。副黏病毒科病毒会导致严重的人类和动物疾病，在病毒家族中，其被认为是"地球上造成疾病负担和经济影响最大的病毒科之一"[1]。

表 87-1　人副流感病毒和腮腺炎病毒的分类

病毒	物种命名	
	旧版	新版[a]
人副流感病毒 1 型	人副流感病毒 1	人呼吸道病毒 1
人副流感病毒 2 型	人副流感病毒 2	人腮腺炎病毒 2
人副流感病毒 3 型	人副流感病毒 3	人呼吸道病毒 3
人副流感病毒 4 型	人副流感病毒 4	人腮腺炎病毒 4
腮腺炎病毒	腮腺炎病毒	流行性腮腺炎病毒

注：[a] 最新版的物种命名见于国际病毒分类委员会（第十次）关于病毒分类的报告（https://talk.ictvonline.org/taxonomy/）

二、病原特征

本章中描述的所有病毒均具有相似的结构，病毒颗粒内为核衣壳，呈螺旋状对称，表面具有包膜，颗粒直径范围通常为 150～350 nm，可呈现出大球形和丝形等多种形态，HPIV-2 多属于后种[2]。病毒颗粒含有单负链，不分节段的 RNA，长度约为 15 kbp，基因组编码 6～11 种常见结构蛋白。其中，L 蛋白（largest protein）分子量最大，为 RNA 聚合酶。L 蛋白与磷蛋白 P（phosphoprotein，P）和核衣壳蛋白 N（或者 NP）（nucleocapsid protein，NP）与病毒 RNA 结合，构成病毒颗粒内部的核壳体。在电子显微镜下可以看到，表面糖蛋白血凝素-神经氨酸酶（hemagglutinin-neuraminidase，HN）和融合蛋白（fusion protein，F）从病毒包膜伸出。腮腺炎病毒属具有第三种膜蛋白，称为小疏水性蛋白（small hydrophobic protein，SH），它是一种 44 个氨基酸的多肽，被认为可以抑制病毒诱导的宿主细胞凋亡。第 6 个结构蛋白是膜（membrance protein，MP）蛋白。在病毒复制过程中，N 蛋白结合病毒 RNA，L 和 P 蛋白在转录和复制过程中发挥作用，HN 和 F 表面糖蛋白与 M 蛋白相互作用，将装配好的核壳体吸附到感染的细胞膜表面区域，该部分细胞膜将在出芽时成为新病毒的包膜。HN 表面糖蛋白也通过唾液酸受体在病毒与宿主

细胞的吸附过程中发挥作用，F蛋白在病毒与宿主细胞膜融合时发挥作用，使病毒核壳体进入并感染宿主细胞。图87-1* 是腮腺炎病毒属与呼吸道病毒属的超微结构图。

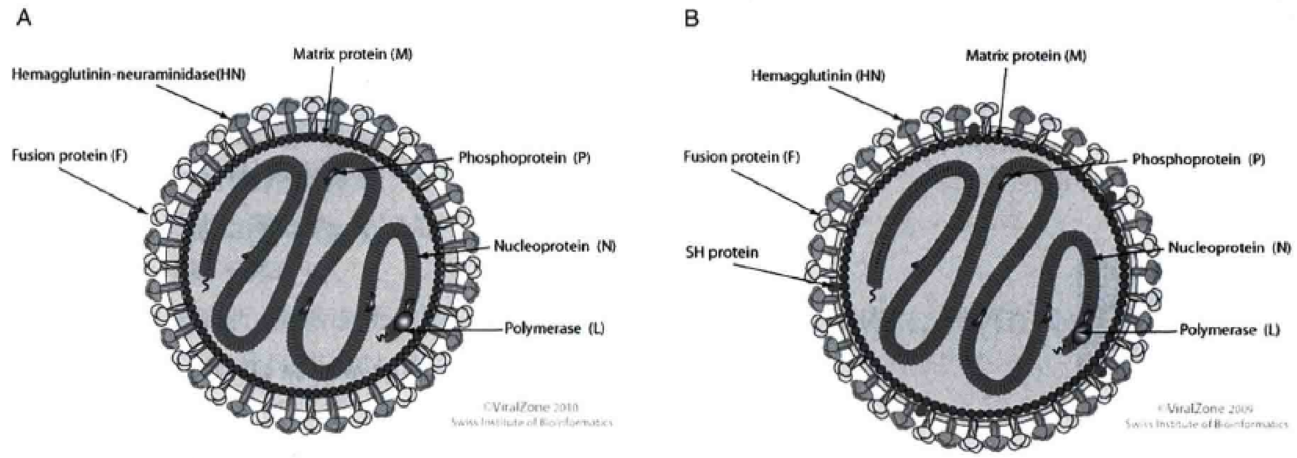


图 87-1 Diagrams of respirovirus (A) and rubulavirus (B) ultrastructures. Particles of both types of viruses contain a single strand of minus-sense RNA encapsidated by L, N, and P proteins. The viral genomes are enveloped by a single layer of cellular plasma membrane, below the surface of which is the viral M protein and within which are embedded the viral transmembrane glycoproteins F and HN. In rubulaviruses such as HPIV-2, HPIV-4, and MuV, SH proteins are also present in the viral envelope. (Used with permission from Swiss Institute of Bioinformatics [http://viralzone.expasy.org].)

HPIV已确定有4个种，即1、2、3和4型。HPIV-4可以进一步细分为HPIV-4a和HPIV-4b；因为这两者之间非常接近，所以本章的其余部分均将其作为HPIV-4进行讨论。腮腺炎病毒只有一个抗原型，不过不同毒株在小疏水性蛋白(SH)编码基因表达上存在差异，这构成了将腮腺炎病毒分类为12种基因型（命名为A～L）的基础。其中，基因型G病毒是引起美国腮腺炎流行的最常见的基因型。HPIV和腮腺炎病毒可在50℃以上温度，有机溶剂、紫外线照射，福尔马林处理、低pH(3.0～3.4)、干燥和脱水条件下灭活。可在−70℃或更低的温度冷冻保存病毒，冻存前添加0.5%牛血清白蛋白、脱脂牛奶、5%甲基亚砜或2%鸡血清可以延长毒株存活时间。

虽然HPIVs和腮腺炎病毒的结构和抗原成分相似，但它们在美国引起（译者注：也适用于美国以外的其他地区）的疾病特点却大相径庭。HPIVs是美国成人和儿童常见的呼吸道感染病原，病毒学实验室通过直接抗原检测、病毒分离和分子生物学方法开展常规检测，其中分子生物学检测方法，如PCR检测，最为常用。另一方面，腮腺炎病毒是1968年有效疫苗出现之前儿童的常见疾病病原之一，现已比较少见。虽然有散发性腮腺炎疫情暴发，但大多数病毒学实验室不再将腮腺炎病毒的分离和鉴定作为重点，而是将这种病原的检测工作委托给公共卫生实验室。由于这些差异，下面将对HPIVs和腮腺炎病毒分别进行讨论。

三、副流感病毒

（一）流行病学和传播

目前认为，HPIVs是通过大的液滴气溶胶和接触污染的表面传播。该病毒已被证明可在多孔表面存活长达10 h；然而，试验表明将HPIV-3放在手指10 min就会丧失90%以上的感染性[3]。目前，在常规医院诊断实验室检测到的所有病毒分离株中，HPIV-1、2、3、4大约占5%[4]。HPIV-1流行通常发生在每年的秋天，每2年1次。HPIV-2发病率一般低于HPIV-1和HPIV-3，可与HPIV-1一起每2年发生1次，或与HPIV-1轮流，或者每年流行。HPIV-3每年发生，通常在

*译者注：原著引用其他著作图，未经原作者授权翻译，故此保留原图

春季和夏季，但在温带地区可以常年流行。近年来，由于更优越的诊断手段（包括多重呼吸道病原体检测方法）的广泛使用，HPIV-4 的发病率高于以往认为的水平，但与其他类型 HPIVs 相比，HPIV-4 造成的严重感染较少。在 2014 年发表的一项回顾性研究中，Frost 及其同事通过分析儿童呼吸道病毒多重分子检测结果后指出，HPIV-4 是儿童呼吸道感染常见的病原体，全年流行，并且在奇数年的秋天达到高峰[5]。

(二)临床意义

HPIVs 与婴儿、儿童和成年人的上、下呼吸道感染相关；然而，严重的感染通常只发生在免疫系统受损的人群中。HPIV 感染的平均潜伏期约为 2～6 天[6]。感染通常是相当温和的，并具有自限性，在发达国家极少导致死亡[7-8]。由于自然感染不能产生终身免疫，再次感染很常见。HPIV 是引起病毒性喉炎的主要病毒，这是 6 个月～6 岁儿童上气道梗阻的最常见原因。喉炎的特点是吸气性喘鸣、犬吠样咳嗽、声音嘶哑[9]。

HPIV-1 与美国报道的超过 50%的喉炎病例相关，大多数发生在 7～36 个月的儿童中。HPIV-2 与免疫功能低下或慢性病的儿童感染相关。HPIV-2 也可在健康儿童导致典型的下呼吸道症状，超过 60%的感染发生在 5 岁以下儿童；主要是 1～2 岁的儿童。HPIV-3 多见于年龄小于 6 个月的婴儿，40%的感染发生在 1 岁以内。只有呼吸道合胞病毒(RSV)导致新生儿和婴幼儿下呼吸道感染超过 HPIV-3。HPIV-4 可引起许多与 HPIV-1、2、3 相同的呼吸道症状；但是，它通常不会引起喉炎[10]。5 岁以下儿童中，病毒性急性呼吸道疾病住院病例中 7%是由于 HPIV 感染而引起[11]。HPIV-1、2、3 感染占美国 5 岁以下儿童下呼吸道感染的 1/3，仅次于 RSV 成为引起儿童病毒性下呼吸道感染住院治疗的第二大原因[12]。

虽然与儿童感染相关，HPIVs 也有引起成人严重肺部感染的可能，HPIV-1 和 HPIV-3 均是导致成人社区获得性肺炎住院的 4 种最常见的病原体之一（译者注：引文指出 4 种常见病原体是 HPIVs、呼吸道合胞病毒、甲型流感病毒、乙型流感病毒，均为季节性病毒）[13]。HPIVs 也会引起老年人下呼吸道感染。在 9 种最常见感染中，HPIVs 感染与 75 岁以上患者的死亡率显著相关；这种相关性比甲型流感病毒和 RSV 低（这 2 种病毒与所有年龄组的死亡率显著相关），不过高于其他病原体[14]。

在免疫功能低下的患者中，特别是先天性免疫缺陷的患者，HPIV 被公认为与发病率和病死率相关，病毒可引起这类人群的胃肠道和泌尿道感染[7]。HPIVs 在呼吸道上皮细胞中可以进行有效的复制，除非患者有严重免疫缺陷，一般不会传播到其他系统[15]。小儿骨髓移植受者中超过 50%的呼吸道感染及小儿实体器官移植受者中超过 19%的呼吸道感染均是由 HPIVs 引起[16]。在 5178 例儿童和成人造血干细胞移植受者中，3.3%可检测到 HPIV 感染，最常见的是 HPIV-3，病毒可造成上、下呼吸道感染，并在下呼吸道感染者中造成不良转归[17]。在囊性纤维化患儿中，3%的患者可检测到 HPIV 感染，仅次于鼻病毒[18]，同样地，在极低出生体重儿中，有 5%感染 HPIV，次于鼻病毒和 RSV[19]。在韩国，HPIVs 是 137 例癌症伴呼吸道病毒感染儿童病例中最常见的病原，其中 80%是院内感染[20]。

目前，美国 FDA 尚无批准的用于治疗 HPIV 感染的药物。利巴韦林已用于治疗免疫功能低下患者的感染，但治疗效果不确定。Elizaga 等[21]报道该疗法没有治疗效果。相反，有报道静脉注射利巴韦林[22]，口服利巴韦林联合甲泼尼龙[23]及早期高剂量利巴韦林干预[24]均成功治疗了 HPIV 感染。新型吸入型抗病毒药物 DAS181（Fludase；AnsunBioPharma)，为治疗 HPIV 感染提供了希望。该药是一种具有唾液酸酶活性的细菌-人重组蛋白，可以切割位于人呼吸道上皮细胞表面的流感病毒和 HPIVs 受体-α(2,3)和 α(2,6)唾液酸[25]。通过这种作用方式，DAS181 使得宿主能够抵抗这些病毒的感染。迄今为止，有关于 DAS181 抗人类副流感病毒感染疗效的研究仍然较少。总体而言，这些研究的受试者包括造血干细胞或实体器官移植的受者，并基于“同情使用方案”使用该临床试验用药。在许多患者中，可以观察到治疗后病毒载量检测不到或明显下降，在几乎所有报道的病例中，治疗后的肺功能均能有一定程度的改善[26-32]。此外，患者似乎对 DAS181 的耐受性良好，在用药期间未出现明显的不良反应。但是，仍然需要进一步研究以充分评估其在治疗 HPIV 相关疾病中的效果。此外，推荐使用

糖皮质激素来缓解症状[9]。

目前尚无 FDA 批准的 HPIV 疫苗。相关研究正在探索利用牛 PIV-3 毒株及含有不同突变的 HPIV 来构建重组减毒活疫苗。所有候选疫苗的安全性和有效性仍然在接受评估；某些候选疫苗的初步数据很有希望[33]。

对 HPIV 感染的诊断主要根据临床症状和体征，可能不是所有的患者都需要实验室诊断。然而，通过实验室检测确认 HPIV 感染已经被广泛应用，能够鉴别诊断许多其他出现类似呼吸道症状的病毒感染，确认感染可以提高对患者的处置能力和降低花费[1,34]。

(三)样本的采集、运送和储存

确认 HPIV 感染的检测包括病毒分离、抗原或抗体检测，以及在现代临床病毒学实验室更为常见的核酸检测(表 87-2)。本书第 4 部分中提供了病毒样本采集、运送和储存指南。对于以免疫荧光为基础的检测，收集呼吸道样本时应注意包含细胞成分。鼻咽和口咽是 HPIV 初始感染的主要复制位置，儿童从临床症状出现前 3～4 天开始，直到发病后 10 天，均会排出病毒。从成人分离获得病毒比从儿童更为困难，不过已证明免疫功能低下患者及成人慢性疾病(尤其是肺部疾病患者)患者排毒期能持续数个月[12]。咽拭子、鼻咽拭子、鼻腔冲洗液和鼻腔吸取物都可以成功检测到病毒，不过鼻咽部位的标本最好，因为这里是初始感染的主要复制部位。进行病毒分离培养鉴定时，应将采集到的标本放在病毒转运液中，并保持在 4 ℃条件下，进行细胞培养接种。推荐标本收集后 24 h 内接种[12]。对于抗原和分子检测，请参考厂家提供的使用说明书，以获取标本采集、处理和储存的详细信息。

用于 HPIV 抗体检测的外周血标本应采用无抗凝剂的采血管采集，并尽快分离出血清，以确保样品的完整性。如果将在 24～48 h 内开展检测，血清样品可保存于 4 ℃，否则应在－20 ℃或更低温度冻存。

表 87-2 副流感病毒和腮腺炎病毒的诊断方法

病毒	方法			
	病毒分离	抗原检测	分子生物学方法	抗体检测
HPIV-1，HPIV-2，HPIV-3	广泛应用；在 PMK 细胞复制 4～8 天；轻度或无 CPE；HAD 阳性	只有 IF[a](用于直接标本检测及培养物确认)；作为单一检测或作为呼吸道病毒组检测的一部分广泛应用；敏感性是培养的 70%～83%	敏感度最高的方法；很多实验室开展作为 HPIV-1、2、3 组合或作为多靶点呼吸道病毒组的一部分	可能在参考实验室开展；与其他副黏病毒科病毒有交叉
HPIV-4	在 PMK 细胞复制 4～8 天；在室温下 HAD 更强	只有 IF(用于培养物确认)；检测并未广泛应用	作为多靶点呼吸道病毒组的一部分	多数实验室不开展
腮腺炎病毒	广泛应用；在 PMK 细胞复制 4～8 天；HAD 阳性	只有 IF(用于培养物确认)检测并未广泛应用	可能在参考实验室和公共卫生实验室开展	免疫状态(IgG)检测被广泛应用。IgM 检测：一些新方法更有效，未广泛应用 与其他副黏病毒科病毒有交叉限制了其在急性期的应用

注：[a]IF. 免疫荧光

(四)直接检测

1. 显微镜 荧光显微镜仍然是直接检测临床标本中 HPIVs 存在的最常用方法；下一节将对此提供更多信息。对于肺、胰腺、肾和膀胱的组织病理学检测可以观察到合胞体(图 87-2)，被感染的宿主细胞表面表达病毒 F 蛋白，介导邻近细胞的细胞膜融合从而出现合胞体这一现象[2]。

2. 抗原检测 常规利用免疫荧光团标记的单克隆抗体(monoclonal antibodies，MAbs)，通过免疫荧光技术检测临床标本中的 HPIV-1、2 和 3 抗原。将鼻咽冲洗液，吸取物和拭子中的细胞固定

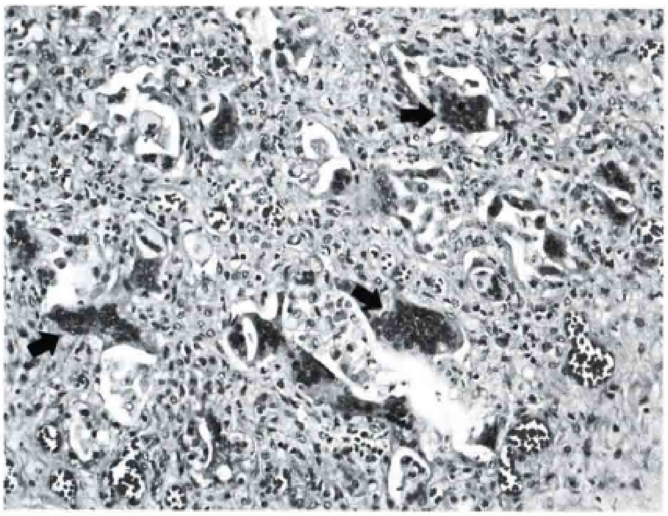


图 87-2 来自死于 HPIV-3 感染的婴儿肺组织切片，经苏木素-伊红染色后可见合胞体（箭头处）。切片可见弥漫性肺泡损伤，间质性水肿，纤维化伴蛋白质性肺泡内渗出液，以及狭缝状受压的肺泡腔，见彩插

在载玻片上，通常是通过数个细胞的斑或点，或对细胞离心来进行固定[35]。至少要有 20 个柱状上皮细胞存在，才能确保检测是有效的。许多实验室使用含有针对 7 种常见呼吸道病原体的混合单克隆抗体进行检测；包括腺病毒、甲型和乙型流感病毒、HPIV-1、2 和 RSV。这些抗体用于直接（DFA）或间接荧光抗体染色法（IFA），检测所有 7 种病毒抗原。当看到阳性结果时，必须进行进一步的检测，以确定是具体哪一种病毒。HPIV 抗原检测的敏感性和细胞培养的病毒分离技术相比，受不同实验室、不同的 DFA 和 IFA 染色方法及试剂而有所差异，据报道敏感性为 70%～83%[35]。特异性很高。

混合和单独用于 DFA 或 IFA 的单克隆抗体在美国有售，并被 FDA 批准可用于检测临床标本和细胞培养物中的 HPIV-1、HPIV-2、HPIV-3 抗原。经销商包括并且不限于如下几个：Diagnostic Hybrids/Quidel (DHI), Athens, OH; Millipore Corporation Light Diagnostics, Temecula, CA; and Trinity Biotech, Carlsbad, CA。经 FDA 批准，用于 HPIV-4 细胞培养物检测的 DFA 法单克隆抗体可从 Millipore 公司获得。感染的细胞显示明亮的荧光，该荧光主要由细胞质（cytoplasmic）成分发出，经常是点状，有不规则的包含体（inclusions）。在参考文献 36 中有关于 HPIV DFA 方法的综述。在书第 8 章中有关于 DFA 和 IFA 的原理的综述。

市场上针对常见的呼吸道病毒的 DFA 法单克隆抗体库分为两种。一种是应用标记的单克隆抗体库对标本进行初始染色，并对 7 种病毒进行筛选（甲型流感病毒、乙型流感病毒、RSV、腺病毒和 HPIV-1～3）；然后制备新鲜涂片，并用单个单克隆抗体染色确定感染的病毒种类。第二种通过光谱叠加的不同的荧光染料同时对一个以上的病毒进行鉴定（Light Diagnostics SimulFluorreagents，Millipore 公司；Duet reagents，DHI）。该试剂被美国 FDA 批准用于直接对临床样品检测和培养物的检测。利用带有用异硫氰酸荧光素（fluorescein isothiocyanate，FITC）滤光片组的荧光显微镜观察染色的待测样品，一种抗体会产生苹果绿色荧光，而第二种抗体将出现金或金橙色荧光。SimulFluor 试剂已显示出对呼吸道病毒检测良好的敏感性和特异性，可与个别染色剂媲美[35]。

还有一种用于细胞快速染色的试剂（D^3 FastPoint；DHI）。本系统的特点是 3 个双标记（R-藻红蛋白与 FITC）的单抗制剂，同时含有碘化丙啶。可以对 HPIV-1、2、3 进行检测，但不能区分这三者。在 FastPoint 检测中，在与 3 种单克隆抗体短暂孵育后，将样品放置于显微镜载玻片上，在液体状态下，用带有 FITC 荧光滤光片组的荧光显微镜检测。在 FastPoint 说明书中提到（https://www.quidel.com/sites/default/files/product/documents/pi-316en_d3_fastpoint_l-dfa_respi_01-120000_v2010jul22_2.pdf），上市前由制造商进行的测试表明，与其他 HPIV 抗原检测方法相比，该方法对 HPIV-1、HPIV-2、HPIV-3 的检测达到 85%～100%的敏感性和 98%～100%的特异性。

大多数呼吸道病毒免疫荧光检测试剂仅筛查 HPIV-1、2 和 3 型，不能检测出 HPIV-4 型。虽然有能够对 HPIV-4 细胞培养物进行免疫荧光染色的单克隆抗体，其并没有被批准用于直接对临床标本中的 HIPV-4 抗原进行检测。

3. 核酸检测技术 在过去十多年中，已经开发出多种用于 HPIV 检测的分子生物学方法，可以直接从临床样本中检测到 HPIV。最初，是用于检测单个 HPIV 的实验室方法。最近，可检测 HPIV 的多重检测方法已获得 FDA 批准用于体

外诊断，这些方法或者单独检测不同型别的HPIV(例如，Prodesse ProParaflu +；Hologic GenProbe，San Diego，CA)或者与其他呼吸道病毒组合检测[例如，Luminex NxTAG respiratory pathogen panel(Luminex Corporation，Austin TX)；ePlex respiratory pathogen panel(GenMark DX，Carlsbad，CA)；FilmArray RP(BioFire Diagnostics，Salt Lake City，UT)；以及 Verigene respiratory pathogens Flex test]。这些方法涉及不同分子生物技术的应用，具有独特的性能特性(表 87-3)。在上述这些检测方法中，除 ProdesseProParaflu + 之外的其他方法均可检测HPIV-4。与抗原检测，病毒分离，以及其他单个或多重分子生物学方法比较，这些方法具有极好的敏感性和特异性，并较传统方法提高了分析物的检测效率。

表 87-3 FDA 批准的可以检测 HPIVs 的呼吸道病毒分子生物学方法

名称(生产商)[a]	能够检测的病毒	方法和检测周期及复杂性
ePlex RP panel (GenMark DX，Carlsbad，CA)	副流感病毒 1～4[也能检测腺病毒；人冠状病毒 229E、HKU1、NL63、和 OC43；人偏肺病毒；人鼻病毒/肠道病毒、甲型流感病毒(H1、H3 和 H1 2009 型)和乙型流感病毒；RSV(A 和 B)]。包括细菌靶标：肺炎衣原体和肺炎支原体	在自成一体的塑料反应袋中，全自动封闭的提取，放大，读数系统。将试剂盒装入并放置在 ePlex 仪器中，该仪器混合/移动试剂，并加热/冷却以进行细胞裂解，核酸提取/纯化，逆转录和 PCR。使用特有的 eSensor 技术。需花费 3～5 min 的手工操作的时间，大约需要 1 h 进行完成测定。一次只能检测一个样品，但是可扩展的测序仪器可以同时容纳多达 24 个样品的分析；中等复杂
FilmArrayRP[b] (BioFire Diagnostics-formerly Idaho Technologies，Salt Lake City，UT)	副流感病毒 1～4[也能检测腺病毒、冠状病毒(HKU1、NL63、OC43 及 229E)人偏肺病毒、甲型流感病毒(H1、H3 和 H1 2009 型)和乙型流感病毒、RSV、鼻病毒/肠道病毒]。包括细菌靶标：肺炎衣原体、肺炎支原体、百日咳杆菌	在自成一体的塑料反应袋中，全自动封闭的提取，放大，读数系统。将反应袋放在仪器装载站，复水后，注入样品。仪器混合/移动试剂，并加热/冷却进行细胞裂解，基于磁珠法分离核酸，逆转录，多重 PCR(第一阶段多重 PCR，第二阶段巢式 PCR)。使用终点 DNA 熔解曲线分析自动生成针对每个靶标的结果。需要 3～5 min 的手工操作时间，1.25 h 完成检测。一次检测一个样品，但是新的可扩展的测试仪器可以同时容纳多达 12 个样品的测定(FilmArray Torch)；中等复杂，授予 CLIA 豁免检验系统
Luminex NxTAG RP panel (Luminex Corporation，Austin，TX)	副流感病毒 1～4[也能检测腺病毒、人博卡病毒、人冠状病毒 229E、HKU1、NL63、和 OC43、人偏肺病毒、甲型(H1、H3)和乙型流感病毒，RSV(A 和 B)]。包括细菌靶标：肺炎支原体、嗜肺军团菌、肺炎衣原体	开放系统，需要单独核酸提取，核酸扩增/磁珠杂交步骤。扩增产物与具有独特 DNA 标记的靶标特异性引物杂交。DNA 聚合酶延伸形成完美互补，将生物素-dCTP 掺入到延伸产物中。延伸产物加入到含有聚苯乙烯微球的微孔中，每个孔包含针对特定病毒靶标的反标签序列，所有这些都是用彩色染料来区分每组珠子。每个标记的引物杂交到其独特的互补反标签序列上。杂交到珠表面的生物素化的延伸产物通过链霉亲和素蛋白分子进行检测报告。杂交并标记了的珠子，在 MAFPIX 仪器上读取。手工操作时间最长，检测周期 6～8 h。批量测试。高度复杂
Prodesse ProParaflu+(Hologic Gen-Probe，San Diego，CA)	副流感病毒 1～3	开放系统，需要单独提取核酸。多重实时荧光 RT-PCR 时使用 Prodesse 多重 HPIV 试剂，检测周期 1～2 h。高度复杂
Verigene RP Flex test (Luminex Corporation，Austin，TX)	副流感病毒 1～4[也能检测腺病毒、人偏肺病毒、甲型流感病毒(H1 和 H3)和乙型流感病毒、鼻病毒]。细菌靶标包括：百日咳杆菌、副百日咳杆菌/支气管败血波氏杆菌和霍氏鲍特菌	部分开放的系统，将核酸提取、靶标扩增和杂交结合到测试盒中，该测试盒由 2 种不同的仪器处理：样品处理器和面板读取器，后者是系统的中央控制元件。4 种一次性使用的耗材组成了测试系统的一部分，其中包括抽取托盘，移液器吸头固定器组件，通用托盘及装有即用型试剂的测试盒。样品在处理元件内进行核酸提取、扩增和纳米粒子杂交，2 h 后，将测试盒转移到读取器中进行解释，耗时 10 s

注：[a] RP. 呼吸道病原体。[b] 在撰写本文时，第二代 FilmArray RP，RP2 和专门用于测试下呼吸道标本的 FilmArray 芯片正在进行临床试验中

与抗原检测和病毒分离相比，分子检测方法的高敏感性对于免疫功能低下的患者和病毒载量可能不高的老年患者尤为重要。大多数大的病毒学实验室采用针对所有常见呼吸道病毒的分子检测技术。随着这项技术进一步完善，并更加地对"用户友好"(如需很少的专业知识，具有更快的检测周期，由于使用封闭系统，减少了复杂的样品处理、仪器操作和设备等)，较小的实验室也将能够利用这一优越的诊断方法。病毒分子诊断专家提醒用户，分子检测方法比较昂贵，应该根据各个实验室的情况及服务的患者人群来谨慎选择。当临床症状与已在特定社区中流行的病毒感染一致时，不建议采用大型的多重呼吸道病毒检测板作为诊断方法[37]。

(五)分离和鉴定

许多常用的细胞系可以培养 HPIV，不过在原代猴肾细胞(primary monkey kidney，PMK)生长最好，包括恒河猴、食蟹猴和非洲绿猴细胞[12]。在细胞培养基中加入 2～3 μg/mlN-甲苯磺酰基-l 苯丙氨酸氯甲基酮处理的胰蛋白酶时，LLC-MK2 细胞也可用于初始病毒分离[12]。Madin-Darby 犬肾(MDCK)细胞、HeLa 细胞、Vero 细胞和 Hep-2 细胞可用于病毒分离物的传代，但不推荐用于初始病毒分离[38]。在撰写本文时，常用的细胞系都可以从 Quidel/DHI 买到。

加入病毒转运液运送的咽拭子标本需要经涡流混合器充分混匀，将拭子挤压管壁将液体挤出后，弃去拭子。然后将转运液以 1500×*g* 离心 10min。弃去细胞培养管中的培养基，将离心后的液体上清接种到培养管的单层细胞上，每管 0.2 ml。接种管在 35～37 ℃温度下水平放置 1 h，弃去接种的液体，加入新的培养基(例如，含有 2% 的胎牛血清的 Eagle 最低基础培养基)。接种的细胞培养管在旋转架中 35～37 ℃培养，并在显微镜下隔天观察，观察 14 天。

一些 HPIV 在接种 PMK 细胞 4～8 天后产生细胞病变效应(cytopathic effect，CPE)，呈圆形细胞并形成合胞体(图 87-3b)。不过，许多 HPIV 在传统细胞培养管较少产生 CPE。庆幸的是 HPIV 会产生血凝素蛋白，插入感染细胞的细胞膜。这些蛋白对红细胞具有亲和性，并介导红细胞对感染细胞的附着，这种现象称为红细胞吸附(hemadsorption，HAD)，这可以作为另一种检测细胞培养物中的 HPIV 的方法。在 HAD 实验中，细胞培养基被稀释的豚鼠红细胞悬浮液替换，将细胞培养管在 4 ℃冷藏 30 min；然后用显微镜检查[4]。当存在能够吸附红细胞的病毒，红细胞会吸附到细胞单层上。如果没有能够吸附红细胞的病毒存在，当将细胞管倾斜或轻拍时，将看到红细胞会自由浮动。在 HAD 检测时要有未感染和阳性感染管对照。可以在培养结束的第 14 天，或在接种后 3～7 天进行 HAD 检测[38-39]。与 HPIV-1、2、3 相比，HPIV-4 在 4 ℃下与红细胞吸附较弱，在室温下与红细胞的吸附更强。其他副黏病毒科家族的成员，包括腮腺炎病毒及其他病毒，如流感病毒，也会呈 HAD 阳性。根据典型细胞病变出现或 HAD 阳性结果可以怀疑有 HPIV 存在，而鉴定病毒必须有确证实验。



图 87-3　HPIV 和腮腺炎病毒接种恒河猴肾细胞(RhMK)产生 CPE

注：a. 未感染的 RhMK 细胞；b. 用产生 CPE 的临床分离株 HPIV-1 感染 RhMK 细胞后，满视野散在分布一些圆形细胞和合胞体；c. 用 MuV 的临床分离株感染 RhMK 细胞后，显示合胞体的形成。b,c 是细胞接种后 6 天，于细胞培养板上拍摄的图片。放大倍数，100 倍，见彩插

如同在HPIV临床标本抗原检测部分提及的，病毒分离物确证实验通常也是利用含有HPIV单克隆抗体的DFA或IFA免疫荧光技术。在多种呼吸道病毒抗体检测试剂盒中带有针对HPIV-1、2、3的单克隆抗体。不过，大多数检测试剂盒不包括HPIV-4抗体，必须单独购买。将感染细胞从细胞培养单层刮下，通过离心浓缩，加到载玻片上，固定，然后染色。荧光显微镜下观察到苹果绿色荧光的时候，可以确定为HPIV感染。也可以通过其他方法来进行确证试验，包括血凝抑制试验、补体结合试验、中和试验和分子生物学测定。这些技术与免疫荧光方法相比费力、耗时，因此很少使用。

利用生长在细胞培养瓶内的盖玻片或微孔板上的细胞进行培养，为传统的细胞管培养HPIV方法提供了另外一种选择。接种过程中的一个重要步骤是将接种后的细胞培养瓶或者培养板700×g离心1 h。接种细胞培养瓶或培养板后，孵育24～48 h或长达5天。利用HPIV单克隆抗体，进行DFA或IFA法检测CPE出现之前的病毒抗原，来检测病毒的增殖。通过细胞培养瓶离心增强接种效果，并在CPE出现之前用免疫荧光染色法检测，已被证明是非常有用的HPIV检测方法。

将雪貂肺(Mv1Lu)和A549细胞在细胞培养瓶中混合培养，称为R-Mix(DHI)，这种细胞已经用于离心法增强接种及CPE出现之前的DFA染色。染色是利用针对7种呼吸道病毒(腺病毒，甲型流感病毒，乙型流感病毒，HPIV-1、2、3，RSV)的混合单克隆抗体库。最近利用3800份临床样本，比较了R-Mix，PMK和A459细胞培养瓶，以及MRC-5细胞的检测敏感性，隔夜孵化后，R-Mix细胞检测到了38株HPIV中的33株(87%)[40]。这包括30个HPIV-1分离株中的26个，所有2株HPIV-2，6株HPIV-3中的5株。MDCK细胞和A549细胞共培养组成了R-Mix Too(DHI)。这种混合细胞是R-Mix的替代品。HPIV能在R-Mix Too很好地增殖(未发表的数据)，并且很容易被检测到(图87-4a～c)。

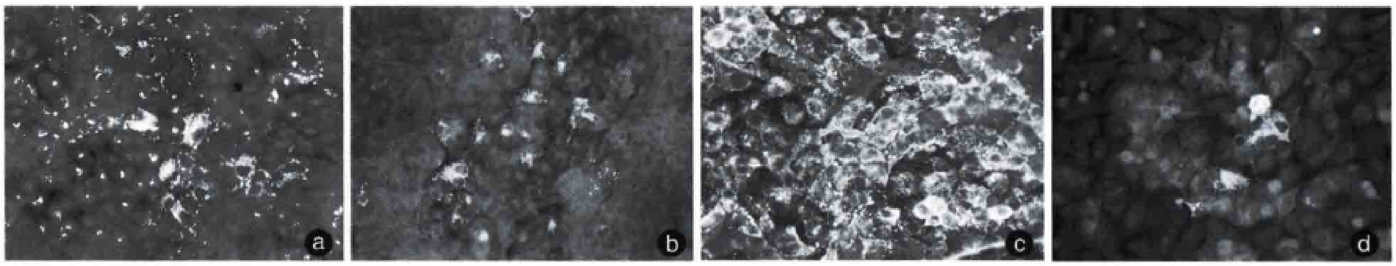


图87-4 HPIV感染的R-Mix Too及腮腺炎病毒感染的R-Mix细胞培养物免疫荧光染色。R-Mix分别被HPIV-1(a)，HPIV-2(b)或HPIV-3(c)感染，以及感染腮腺炎病毒的R-Mix细胞(d)。放大倍数均为200倍。a～c. 感谢印第安纳病理学图片(Indiana Pathology Images)提供；d. 感谢Diagnostic Hybridsy, Inc., Athens, OH. 见彩插

此处列出了生产商建议的R-Mix和R-Mix Too(DHI)使用手册概述，不过，其可以根据实验室情况来调整以满足需要。简单来说，用于检测呼吸道病毒的临床标本接种到3个R-Mix或R-Mix Too细胞培养瓶，离心(700×g离心1h)。在16～24 h，将其中一个细胞培养瓶用呼吸道病毒筛选试剂(针对7种呼吸道病毒的检测)进行检测。如果观察到荧光，则将另外的细胞培养瓶上的细胞刮下，用磷酸盐缓冲液洗涤，并点样到8孔载玻片上；其中7孔分别加入呼吸道病毒的单克隆抗体进行染色，第8孔作为对照。如果第1个细胞培养瓶没有观察到荧光，则继续放置16～24 h后对第2个细胞培养瓶进行染色。如果第2个玻片是阳性的，则从剩下的细胞培养瓶上刮下细胞，进行如上所述检测。如果第2个玻片依然是阴性的，则可以认为7种呼吸道病毒阴性(即，将剩下的玻片丢弃，培养终止)，也可以将第3个玻片一直放置到第7天，观察CPE。

(六)血清学试验

多数儿童在出生时就带有来自母体的HPIV中和抗体，但这些抗体在6个月时就会消失，从而导致超过2/3的儿童在出生后一年以内就会感染HPIV。大多数孩子很早就有HPIV-3感染的血

清学证据，HPIV-1 和 2 抗体的产生较晚一些，在 2～3 岁。HPIV-4 的抗体高峰期是在学龄儿童[12]。多数儿童初次感染 HPIV 后会产生免疫球蛋白 M（immunoglobulin M，IgM），因此单样本 IgM 检测阳性可作为近期感染的诊断依据。同样，间隔两周采集的血清样品进行系列倍比稀释，其 IgG 抗体水平显著增加 4 倍或以上，支持近期感染的诊断。各种 HPIV 类型之间及其与其他副黏病毒（如流行性腮腺炎病毒）之间存在交叉反应性，使血清学诊断更为困难。各种方法对 HPIV 不同型别的血清学分型均不可靠；只能通过病毒分离，以及利用单克隆抗体进行抗原分型或进行病毒 RNA 检测来进行鉴定。

针对 HN 蛋白的抗体可能出现早，不过 HN 和 F 蛋白的抗体都应该是有保护作用。免疫状态检测对 HPIV 诊断并不是很有用。因为病毒分离、病毒抗原和核酸检测方法的普及和可靠性的提高，血清学试验一般很少用于诊断。

在本书第 8 章中对各种免疫检测方法的原理进行了详细描述。HPIV 抗体可以通过多种方法检测，包括血凝抑制、补体结合和中和试验；所有这些方法都是检测总抗体（IgG 和 IgM），由于其操作麻烦，多数实验室不采用这些方法。之前文献详细报道了检测 HPIV 抗体的血凝抑制试验的步骤[38]。HPIV 抗体检测可以利用酶免疫分析法（enzyme immunoassay，EIA），但没有商品化试剂盒。补体结合是最不敏感的抗体检测方法，而 EIA 最敏感。

（七）结果的评价、解释和报告

利用传统或者细胞培养瓶或者微孔板进行病毒分离及检测临床标本中的 HPIV RNA，是确证各型 HPIV 当前或最近感染的最好的证据，因为 HPIV 很少在无感染的情况下存在。快速报告阳性结果非常重要[27]。检测 HPIV 在内的多种病毒的分子生物学方法能够快速产生结果，变得越来越普及，由于其良好的敏感性和特异性，该方法将成为首选的诊断方法。虽然通过免疫荧光法检测抗原的敏感性低于细胞培养或分子生物学方法，不过其能够快速得到结果，并具有高特异性，对于患者的管理非常有用。由于与副黏病毒科其他病毒存在交叉反应，血清学和免疫状态检测方法很少用于 HPIV 感染的确证。

四、腮腺炎病毒

（一）流行病学和传播

在 20 世纪 60 年代末实施大规模疫苗接种之前，美国每年有超过 15 万腮腺炎病例。腮腺炎疫苗与麻疹和风疹疫苗合并为三价疫苗（MMR）。在美国，MMR 的初次接种是给予 12 月龄到 15 个月龄的儿童（译者注：我国自 2020 年 6 月起，在全国范围内实施两剂次麻疹-腮腺炎-风疹联合减毒活疫苗免疫程序，8 月龄和 18 月龄各接种 1 次）。接种疫苗使腮腺炎的发病率显著下降，到 1985 年，美国的腮腺炎病例不到 3000 例。在 1986 和 1987 年各有一次小的腮腺炎再发流行，发病人数达到 8000 到 12 000 例。随后，相关规定要求接种第 2 次 MMR 疫苗。这一次是给 4～6 岁或 11～13 岁[41]的儿童接种，也可以在初次接种 28 天内再次接种，并期望获得终身免疫。美国的腮腺炎病例数持续下降，直到 2006 年中西部州发生了 20 年来最大的腮腺炎暴发疫情[42]。这一次疫情造成 6500 例以上的感染患者。年龄在 18～24 岁的人群腮腺炎的发病率最高；其中 83％为在校大学生，而本组人群中的 84％及所有受感染者中的 63％，已接种了 2 个剂量的腮腺炎疫苗。这次疫情的原因尚不清楚。可能的解释包括免疫减弱，以及疫苗对流行的野生型病毒诱导的是不完全免疫[42]。此外，1999－2004 年，美国的腮腺炎抗体阳性率的总体估计是 90％[43]。这是获得群体免疫所需要的免疫水平（90％～92％）的下限。

2009－2010 年，美国发生了另一次腮腺炎暴发。暴发起始于纽约正统犹太男孩夏令营，并导致 3502 例腮腺炎病例，其中 97％是正统犹太教人，其中大部分住在纽约的 3 个社区[44]。与 2006 年疫情类似，有较高比例的个体既往已经接种了一剂（14％）或者二剂（76％）MMR 疫苗。因此疫苗诱导的抗腮腺炎病毒保护性的减弱再次被认为是一个原因。此外，它的结论是，腮腺炎病毒临床感染所需的免疫水平可能取决于所涉及的病毒的暴露量的大小，提示特定的抗体滴度与抗感染保护性不是绝对的[44]。不过，有一个在 2006 年堪萨斯疫情暴发前对学生血清抗体水平的研究，结果表明，感染了腮腺炎病毒的人，其暴发前中和抗体滴度显著低于在暴发时既没有暴露也没有感染的

人及暴露但没有感染的人。不过，虽然那些感染了腮腺炎病毒的人比未感染的人暴发前腮腺炎病毒抗体水平低，但他们的抗体滴度是有重叠的，未能清楚地分开不同群体的分界点[45]。

在写本书的时候，美国腮腺炎的发病率已经回到了2006年暴发前的水平。自2014年以来，每年记录的腮腺炎病例数超过1000。2016年，疾病预防控制中心(Centers for Disease Control and Prevention，CDC)记录了约5800例腮腺炎病例；从2018年1月1日至9月9日，CDC收到了来自全美47个州约4439例腮腺炎病例的上报[46]。目前还不清楚是否需要改变疫苗本身或疫苗的管理计划，以防止腮腺炎病毒未来在美国的暴发。研究表明，在某些后来被腮腺炎病毒感染的疫苗接种者中，对病毒的易感性可能与疫苗诱导的抗MuV-IgG抗体的亲和力明显降低和(或)保护抗体浓度随时间下降有关[47-48]。最近，对当代流行的腮腺炎病毒谱系进行的比较基因组分析表明，出现了目前疫苗可能无法提供足够保护的毒株，这表明需要重新制备疫苗[49]。腮腺炎在全球仍很常见，多春季发病，好发于未接种疫苗的6～10岁儿童。

该病毒通过呼吸道飞沫或污染物从人传播到人，具有高度传染性，第一次接触病毒时大约会有85%的易感者被感染。人类是已知的唯一宿主。病毒最初在上呼吸道上皮细胞和局部淋巴结中复制。初始复制后产生病毒血症，从而导致唾液腺及其他部位感染。在腮腺炎发作前7天及后8天均可分离到腮腺炎病毒，病毒载量最高并且最容易分离到病毒的时期是最接近腮腺炎发作时，此后病毒载量迅速下降。疾病传播可能发生在腮腺炎发作的5天之内。潜伏期和亚临床感染时也会传播病毒[50]。发病后在尿中排泄病毒可达14天。

(二)临床意义

腮腺炎的平均潜伏期为16～18天。腮腺炎病毒感染在25%～30%的病例中是无症状的，在50%的病例是非特异性症状或呼吸道症状。症状通常是轻微的，其特点是体温轻度升高，在30%～40%病例会导致一侧或双侧腮腺肿大。腮腺炎的并发症包括脑炎(15%的病例)，青春期后男性睾丸炎(20%～30%)、女性的卵巢炎(7%)。腮腺炎也会导致关节炎和胰腺炎。

当流行性腮腺炎是一种常见的儿童疾病时，诊断主要是根据其临床表现。随着腮腺炎发病率的降低，许多医生不能很容易辨认出这些症状。此外，可能免疫功能低下或者缺陷的人的临床症状不典型。腮腺肿大是临床诊断的标志，但在其他病毒性及非病毒性疾病或病情时也会出现，如果仅使用临床症状和体征进行诊断，会使得腮腺炎病毒感染的诊断复杂化。既往接种过MMR疫苗的儿童的急性腮腺炎样症状与EB病毒、HPIV、腺病毒和人疱疹病毒6型相关[51]。因此，现在更重要的是对腮腺炎病毒感染的实验室确认。

(三)标本的采集、运送和储存

公认的腮腺炎病毒感染诊断的实验室检测标准包括：从临床标本分离到病毒、利用分子生物学方法检测腮腺炎病毒RNA分子、恢复期较急性期血清抗体滴度的显著升高、或腮腺炎病毒IgM抗体阳性。本书第81章中介绍了样品采集、运输和保存的指南。诊断流行性腮腺炎疫苗未接种者和疫苗接种者的标本采集指南不同。对这两种宿主的样品采集程序如下所述。

可用于腮腺炎病毒细胞培养的标本包括：唾液或口腔拭子、血液、尿和脑脊液(cerebrospinal fluid，CSF)。在腮腺炎发作7天前或发病后8天可以从唾液和口腔拭子中分离到病毒，症状出现后长达2周可从尿中分离到病毒，脑膜炎时可从脑脊液中分离病毒，在外周血中很少分离到病毒。咽拭子和尿样本对于MuV的分离效率是相似的[52]。在感染过程中，最好在早期病毒载量较高时采集标本。在既往接种过疫苗的个体，应更早采集用于病毒分离和分子检测的样品。在这部分患者中，只有在发病后的3天内采集的标本才能分离到病毒或者得到分子检测阳性结果[53]。该病毒在4 ℃可以存活数天，不过最好在样本采集数小时之内接种敏感细胞。在−70 ℃或更低温度下，该病毒可存活数月或更长的时间。CDC网站提供关于标本采集(用于病毒检测的样品，以及用于抗体检测的血液样本)、保存和运输的材料和方法(http://www.cdc.gov/mumps/lab/specimen-collect.html)。

另一种采集血清的方法是通过针刺手指、针刺足跟或静脉穿刺得到全血，点在滤纸上并干燥。再将干燥血液样本洗脱和稀释后，可用商品化血

清抗体检测方法检测腮腺炎病毒抗体。EIA方法检测血斑中腮腺炎病毒IgG和IgM抗体的结果与新鲜血清检测结果具有很好的相关性。干血斑可保存6～24个月，对抗体检测结果无明显影响[54]。

为了比较IgG或总抗体水平，应收集两份样品，第一份（急性期）在出现症状后应尽快采集，第二份（恢复期）在急性期后2～3周后采集。IgM抗体检测仅需发病4～10天内的单份血清。如果血清学测试的目的只是确定患者的腮腺炎免疫状态，随机收集单份血清样本就足够了。对以前接种过疫苗的人，进行连续系列样品的IgG水平检测及对感染早期单份样本的IgM水平检测，均不是确诊腮腺炎病毒感染的有效诊断方法。

(四)直接检查

1. 显微镜检查 流行性腮腺炎的诊断通常不包括活检标本的检查。不过，显微镜下显示被感染的唾液腺呈现由巨噬细胞、淋巴细胞和浆细胞浸润导致的间质水肿，压迫腺泡和导管。中性粒细胞和坏死的碎片可能会充满导管管腔，导致局部导管上皮细胞损伤[36]。

2. 抗原检测 在20世纪70年代早期，就报道了利用免疫荧光法检测脑脊液和唾液腺细胞中的腮腺炎病毒抗原[55-56]。最近的研究显示，利用腮腺炎病毒的咽拭子标本进行免疫荧光染色检测病毒抗原，其敏感性与腮腺炎病毒分离培养相比高达98%～100%[52]。虽然腮腺炎病毒单克隆抗体是有市售的，但大多数未经FDA批准用于直接检测组织和其他临床标本中的腮腺炎病毒抗原，大多数病毒学实验室不提供腮腺炎病毒的直接抗原检测。

3. 核酸检测 已开发各种分子生物学方法，以辅助腮腺炎的诊断。利用逆转录(RT)-PCR方法，已经在口腔液、脑脊液[57-58]、唾液或咽部、尿[58]标本及腮腺炎病毒细胞培养物中检测到该病毒[57]。

虽然目前还没有市售的FDA批准的腮腺炎病毒分子生物学检测方法，但CDC建立和标化了两种方法，相关信息见网站。一种是标准RT-PCR检测法，提供了检测步骤和所用商品化试剂的来源，可以检测腮腺炎病毒SH基因，一种是由CDC提供的实时RT-PCR检测。分子检测比病毒分离更为敏感，可以提供*SH*基因的编码区序列信息，可用于确定病毒的基因型。先进的具有分子检测能力的实验室可以进行腮腺炎病毒RT-PCR检测，但最常规的病毒学实验室主要依靠腮腺炎病毒分离作为诊断的标准方法。

(五)分离与鉴定

腮腺炎病毒可在常用于传统细胞培养的细胞系中增殖，包括PMK细胞、人新生儿肾细胞、HeLa细胞和Vero细胞。最近证明，狨猴淋巴母细胞系B95a分离腮腺炎病毒时与PMK细胞一样敏感[59]，称为Vero/Slam的杂交Vero细胞系已用于腮腺炎病毒分离，这种细胞系转染了携带人CDW150基因的质粒，该基因是一种信号淋巴细胞活化分子(SLAM)[60]。虽然这种细胞最初用于分离麻疹病毒，现已被证明可以有效用于腮腺炎病毒的分离[53,61]。对拭子标本的病毒分离培养物的检测同上述“副流感病毒”的“分离与鉴定”部分。

感染腮腺炎病毒的典型细胞病变(CPE)是圆形细胞和多核巨细胞（图87-3c），在35～37℃培养6～8天出现。不过，CPE可能会不明显，也有可能不出现CPE，也有可能与内源性污染病毒造成的类似的CPE相混淆。与HPIV类似，腮腺炎病毒的血凝素蛋白插入感染细胞的细胞膜，所以可以用HAD方法检测被腮腺炎病毒感染的细胞。在上面介绍的“副流感病毒”的“分离与鉴定”部分有关于HAD的操作方法。无论观察到CPE或HAD结果阳性，都必须对腮腺炎病毒继续进行确证实验。IFA染色用于常规腮腺炎病毒的确证检测。Millipore公司用于细胞培养物检测的IFA检测单克隆抗体已经获得美国FDA批准。

许多实验室目前使用离心增强接种和单克隆抗体，在接种后24～48 h内（在出现CPE之前）检测腮腺炎病毒。不同细胞系可置于细胞培养瓶或微孔板培养。离心速度和时间可能会有所不同，可以从700×*g*离心45 min[52]到3000×*g*离心20 min[40]。66%的阳性标本是在接种细胞培养瓶后2天内确定的；经过5天的培养后，与传统腮腺炎病毒细胞培养分离方法相比，细胞培养瓶敏感性达到96%[62]。比较各种细胞系细胞培养瓶分离腮腺炎病毒的效率，Vero和LLC-MK2细胞最为敏感（100%），其次是MDCK（78%）、MRC-5

(44%)和 HEp-2 细胞(22%)[63]。腮腺炎病毒也可以用 R-Mix 进行病毒分离(图 87-4d)。在上文“副流感病毒”的“分离与鉴定”部分有厂家提供的 R-Mix(DHI)操作流程。

由于腮腺炎病毒在既往接种过疫苗的个体的口腔排毒量降低,因此可能很难分离到病毒[64]。在腮腺炎症状出现 3 天内采集标本进行培养可能有助于检测到病毒的存在,但阴性结果不能排除感染[42]。

(六)血清学试验

在腮腺炎病毒临床症状出现后 3~5 天内就可以检测到 IgM 抗体,持续 8~12 周。在症状出现 7~10 天内可以检测到 IgG 抗体,可以持续高水平数年,并且终身可以检测到。传统腮腺炎血清学诊断是检测单份样品的病毒特异性 IgM,或检测间隔 2 周采集的血清中的 IgG 或总抗体,采用 2 倍系列倍比稀释,出现 4 倍或以上升高则确认感染。腮腺炎病毒感染产生的抗体往往与其他相关病毒存在交叉反应,结果解释比较复杂。流行性腮腺炎的免疫状态分析可以提示腮腺炎病毒 IgG 抗体是否可检测到,或是不存在,或检测不到。因为特定抗体水平与保护性的相关性并不明确,这些定性的结果就足够了,没有必要报告抗体滴度[44-45]。腮腺炎病例在美国目前比较少,多数实验室专注于腮腺炎病毒血清免疫状态检测。

在既往接种过疫苗的人群中,血清学诊断的作用非常有限。二次免疫应答产生的 IgM 可能很弱或没有。在最近的一次暴发,在既往疫苗免疫的感染者中仅有不到 15%的病例检测到了腮腺炎病毒 IgM 抗体,而其中 95%的患者呈腮腺炎病毒 IgG 抗体阳性[53]。腮腺炎病毒 IgM 抗体假阳性结果并不少见,除了与许多其他病原体存在交叉反应之外,还可见于怀孕的个体和其他没有腮腺炎病毒感染症状的人。因此,MuV-IgM 检测应仅限于临床上出现 MuV 感染症状的患者,同时应与其他诊断检测,如 MuV-PCR 或病毒分离培养联合使用。此外该方法不应用于确定个体的免疫状态。

在本书第 8 章有免疫分析的基本原理介绍。腮腺炎病毒抗体可用多种方法检测,包括血凝抑制、补体结合与中和试验;所有这些方法都是检测总抗体(IgG 和 IgM)。这些方法通常比较费力,只是在参考实验室或专业实验室中开展。腮腺炎病毒抗体血凝抑制试验的详细过程之前已经发表[65]。可用不同的腮腺炎病毒抗原 V 和 S 进行补体结合实验。针对 S 抗原的抗体出现较早,并迅速上升,相反,针对 V 抗原的抗体出现较晚。V 和 S 抗体同时存在是近期感染的信号,而 V 抗体单独存在提示是既往感染[38]。近来有报道用 IgM 捕获 EIA 法检测腮腺炎病毒的 IgM 抗体[53]。

大多数诊断实验室使用市售的手动或自动化形式的腮腺炎病毒抗体 EIA 检测试剂盒,或 IFA 检测系统,进行腮腺炎病毒的抗体测定。这些方法大多只是检测腮腺炎病毒 IgG 抗体。感染会产生针对各种腮腺炎病毒蛋白的抗体,但与保护作用最密切相关的是腮腺炎病毒 HN 蛋白抗体。每种产品均包括操作方法及合适的试剂和对照,要产生高质量的结果需要遵循厂家的操作指南。因为需要严格遵循厂家的操纵指南,此处不列出抗体检测的步骤过程。在敏感性或特异性方面并未显示出哪种试剂更为优越。

对既往免疫接种或自然感染的个体,标准检测病毒或者病毒特异性抗体的方法的检测结果并不一致。利用 EIA 检测活化的腮腺炎特异性抗体分泌记忆 B 细胞(ASCs/浆母细胞)是更可靠的方法[66]。只有近期被活化后,才能够检测到血循环中的 ASCs。在检测 ASCs 时,在外周血单个核细胞中加入多克隆有丝分裂原进行培养,并通过暴露于病毒抗原来检测到 ASCs。用此方法,可以在近期接种了 MMR 的个体和腮腺炎暴发期间的临床病例中检测到腮腺炎 ASCs。当感染的时间已经较长,ASCs 检测比 RT-PCR 或 IgM EIA 具有更高的检测敏感性,可用于一般标准方法不能确定的感染或者暴发时无症状接触者的检测。有趣的是,腮腺炎产生的 ASCs 数量似乎比麻疹或风疹的 ASCs 低,表明腮腺炎病毒感染可能不能产生很强的 B 细胞记忆反应[66]。

(七)结果的评价、解释和报告

用传统细胞培养或者细胞培养瓶/微孔板培养获得腮腺炎病毒,是当前或近期感染的证据。在临床标本中检测到腮腺炎病毒 RNA 也是证据。快速抗原检测也可以证实腮腺炎病毒的存在。不过,无论是分子生物学方法还是快速抗原检测,在美国实验室都不是常规检测方法,因此 MuV 分离

培养仍然是最敏感的方法。血清学方法不能那么直接的确诊腮腺炎病毒感染。在感染相关病毒(包括其他副黏病毒，如HPIV-1、2、3、4)的患者，腮腺炎病毒IgM抗体和IgG抗体可以显著增加。总之，通过同时检测腮腺炎病毒抗体及其他相关病毒抗体，可以排除相关病毒的交叉反应性。抗体水平增加幅度最大的应该鉴定为真实的感染病原。鉴于血清学试验特异性的不足，病毒分离和检测临床标本中的RNA(最好是口腔拭子)是确认未接种疫苗个体的腮腺炎病毒感染的最有效的方法。

病毒分离及RNA的检测被推荐用于有疫苗接种史的个体的检测，口腔拭子应在早期(腮腺炎发病3天内)采集，因为这些个体的病毒复制时间很可能更短。尽管有这些建议，应该承认，没有哪个传统的诊断方法能够有效诊断既往疫苗接种者的腮腺炎感染。IgM不是总能被检测到，所以不是近期感染确证的可靠指标。病毒检测也不一定稳定，可能会由于低病毒载量而导致阴性。其他方法可能有更好的诊断效果。最近的数据显示，2009年暴发的资料显示，在既往接种过疫苗的个体，使用CDC的IgM捕获法比商品化检测方法具有更高的敏感性(CDC捕获法为50%，其他商品化方法为9%～24%)[67]。此外，以核蛋白RNA为靶标比以SH为靶标的实时PCR方法的敏感性高。CDC提供腮腺炎检测的在线指南见网站http://www.cdc.gov/mumps/lab/qa-lab-test-infect.html。

参考文献请扫二维码查阅

第 88 章　呼吸道合胞病毒和人偏肺病毒

N. ESTHER BABADY, YI-WEI TANG

（王一民　译；周柯、徐修礼、汤一苇　审校）

一、呼吸道合胞病毒

（一）分类学

呼吸道合胞病毒（respiratory syncytial virus，RSV）属于单股负链病毒目（*Mononegavirales*）、肺炎病毒科（*Pneumoviridae*）、正肺病毒属（*Orthopneumovirus*）[1-2]。该属还包括一些形态学和生物学类似的动物病毒，例如，鼠肺炎病毒、牛 RSV、绵羊 RSV 和山羊 RSV 等。RSV 和其他肺炎病毒与副黏病毒科病毒的区别主要在于基因的数量和序列不同，以及凝血素和神经氨酸酶活性的缺失。人类于 1957 年首次利用细胞培养技术从肺部疾病患者中分离到该病毒[3]。RSV 的命名源于其能在非极性上皮细胞的单层细胞培养中形成多核巨细胞（合胞体）[4-5]。目前，只鉴定出了一种 RSV 的血清型，进一步可细分两种主要抗原型，分别命名为 RSV A 和 RSV B[1-2]。两种亚型间的差异主要归因于 G 蛋白的变异性，两个型别间仅有 1/6 的 G 蛋白抗原表位是相同的[1,6]。一些研究显示 RSV-A 型病毒的毒力可能比 RSV-B 型更强，A 型病毒感染的住院婴儿会出现更为严重的临床症状。

（二）病原体描述

RSV 为有包膜、单股负链、非节段的 RNA 病毒，其基因组包含了 10 个基因。这些基因参与了转录成 11 个单顺反的、聚腺苷化的信使 RNA（mRNA），每个 mRNA 编码一条主要的多肽链（图 88-1）[1-2]。病毒的脂质包膜来源于宿主细胞的质膜，并由 3 种结构蛋白构成：融合（fusion，F）蛋白、糖基化（glycosylated，G）蛋白和短疏水（short hydrophobic，SH）蛋白。其中，F 蛋白通过病毒包膜与宿主细胞膜融合启动病毒穿入，并通过将感染细胞与邻近未感染细胞融合继而促进病毒扩散。在 RSV 感染过程中，G 蛋白介导病毒黏附宿主细胞，而 SH 蛋白在高尔基复合体的脂筏结构上聚集[1-2]。其他 6 个结构蛋白包括：核蛋白（nucleoprotein，N）、磷酸化蛋白（phosphoprotein，P）、聚合酶或大蛋白（large protein，L）、基质蛋白（matrix protein，M），以及 M2-1 和 M2-2 两种蛋白[1-2]。N 蛋白是病毒核衣壳的主要结构蛋白，P 蛋白和 L 蛋白（聚合酶或大蛋白）主要参与病毒的转录和复制[1,7]。M 蛋白存在于去污剂可溶解的核心部分，并能在病毒准备出芽时抑制病毒的复制。M2-1 蛋白是一个转录调控因子，其作用在于促进 M 蛋白和 N 蛋白的结合，然而 M2-2 蛋白的作用至今尚不明确[1-2,7]。NS1 和 NS2 蛋白是肺炎病毒（*Pneumovirus*）独有的 2 个非结构蛋白。

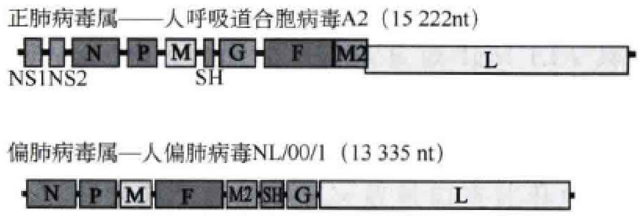
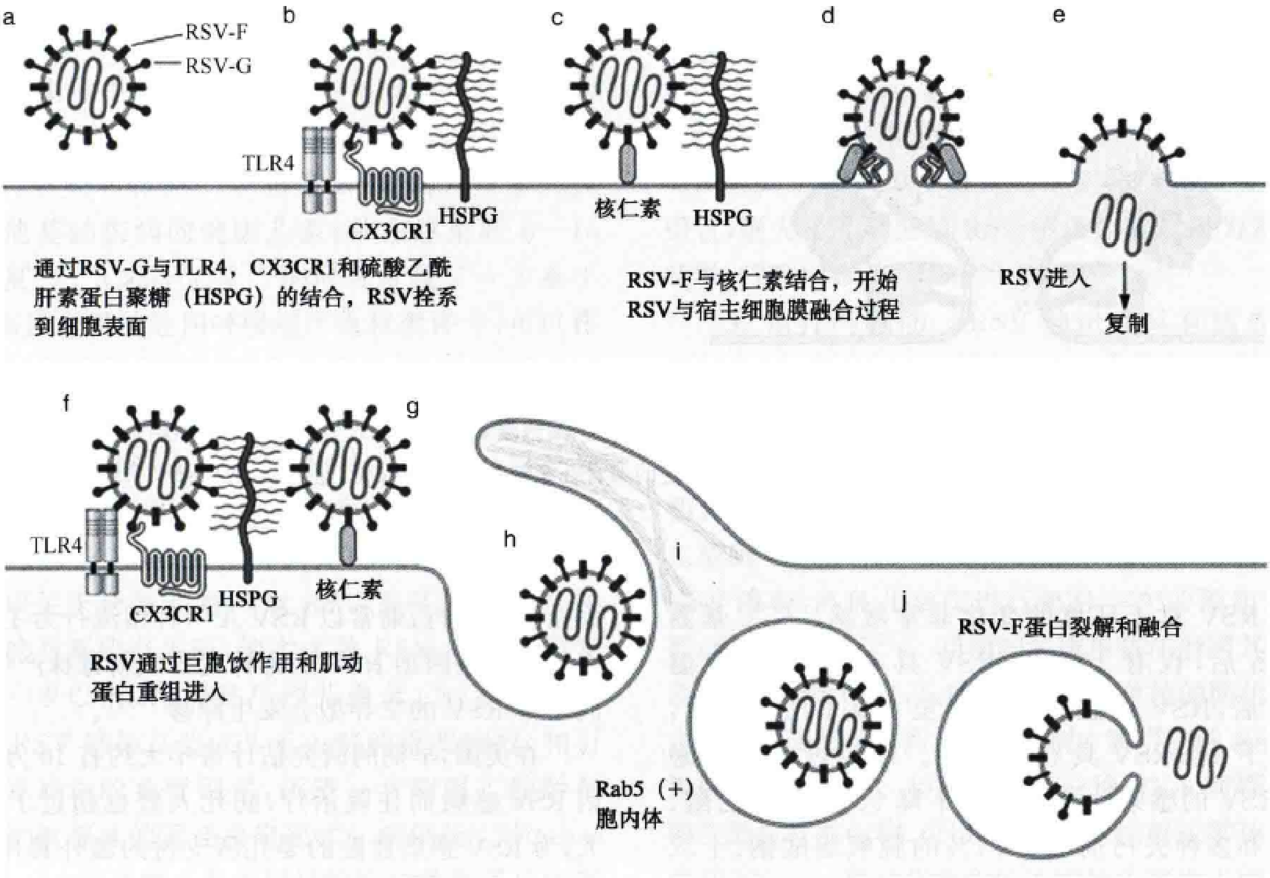


图 88-1　肺炎病毒科。肺炎病毒科的代表成员基因组结构。基因组 RNA 图谱，按照编码方向（3′～5′）成比例绘制。每个黑框代表一个基因，编码单独的 mRNA。肺炎病毒科病毒成员的 M2 mRNA 有 2 个重叠的可读框（ORF），M2-1 和 M2-2（图中未显示）。正肺病毒属中，人 RSV 病毒的 M2 和 L 基因部分重合（交错黑框）。基因间的序列长度可变（长度 1～190 nt）。图片来源：转载经过国际病毒分类委员会（ICTV）许可 https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_online_report/negative-sense-rna-viruses/w/pneumoviridae#Summary，见彩插

在过去十年中，人们对于 RSV 入侵、复制、释放过程的理解取得许多重要进展[2,8]。图 88-2a 展示了 RSV 与宿主细胞结合和侵入的过程。RSV 病毒颗粒的主要中和决定因素是 RSV-F 糖蛋白。RSV-F 蛋白介导了病毒包膜与宿主细胞膜的融合反应，进而将病毒衣壳核心内容物输送到细胞内(图 88-2b)。RSV-F 蛋白在融合前的构象被称为融合前体 F，是 RSV 病毒表面的一个三聚体。最近研究解析出了融合前及融合后的 RSV-F 蛋白结构[9]。在融合过程中，RSV-F 蛋白经历多次构象改变，使病毒包膜和宿主细胞膜紧密接合。破坏 F 蛋白的活性会干扰病毒入侵过程，从而保护宿主不被感染[9-10]。



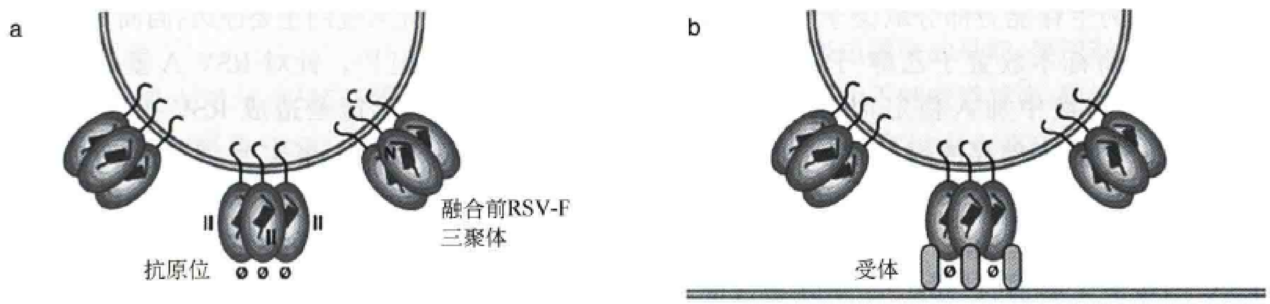


图 88-2　RSV 复制。(上图)RSV 结合和进入宿主细胞。RSV(a)受体(b)结合到 RSV-G 糖蛋白上，并将病毒颗粒固定在细胞表面，启动病毒侵入(c)，激活病毒与宿主细胞膜(d)融合过程。病毒体与细胞膜融合，并进入细胞，这是病毒侵入细胞的最后一步，是病毒在宿主细胞内成功复制的必需步骤(e)。宿主细胞对于 RSV 病毒的巨胞饮(macropinocytosis)作用也是 RSV 进入的一条路径(f)。目前还不清楚这个过程涉及的受体(g)。宿主细胞对于病毒的内化作用(h)是依赖于肌动蛋白重排、磷脂酰肌醇 3-激酶(PI3K)活性和宿主细胞早期胞内体 Rab5＋囊泡(i)。在囊泡中，对 RSV-F 蛋白的溶蛋白裂解可使病毒和胞内体膜融合，使病毒衣壳内容进入宿主细胞(j)。(下图)RSV 包膜与细胞膜的融合过程。RSV 包膜上有多个突出的 RSV-F 融合糖蛋白，通过跨膜结构域锚定于包膜上(a)。在融合前状态，RSV-F 是以一种弹簧负荷三聚体的形式存在，其主要中和表位位于 N 端。主要抗原位点 Ø 只在融合前三聚体中存在，而在融合后缺失。RSV-F 三聚体和宿主细胞受体的相互影响可能是导致 RSV-F 发生巨大构象变化(b)

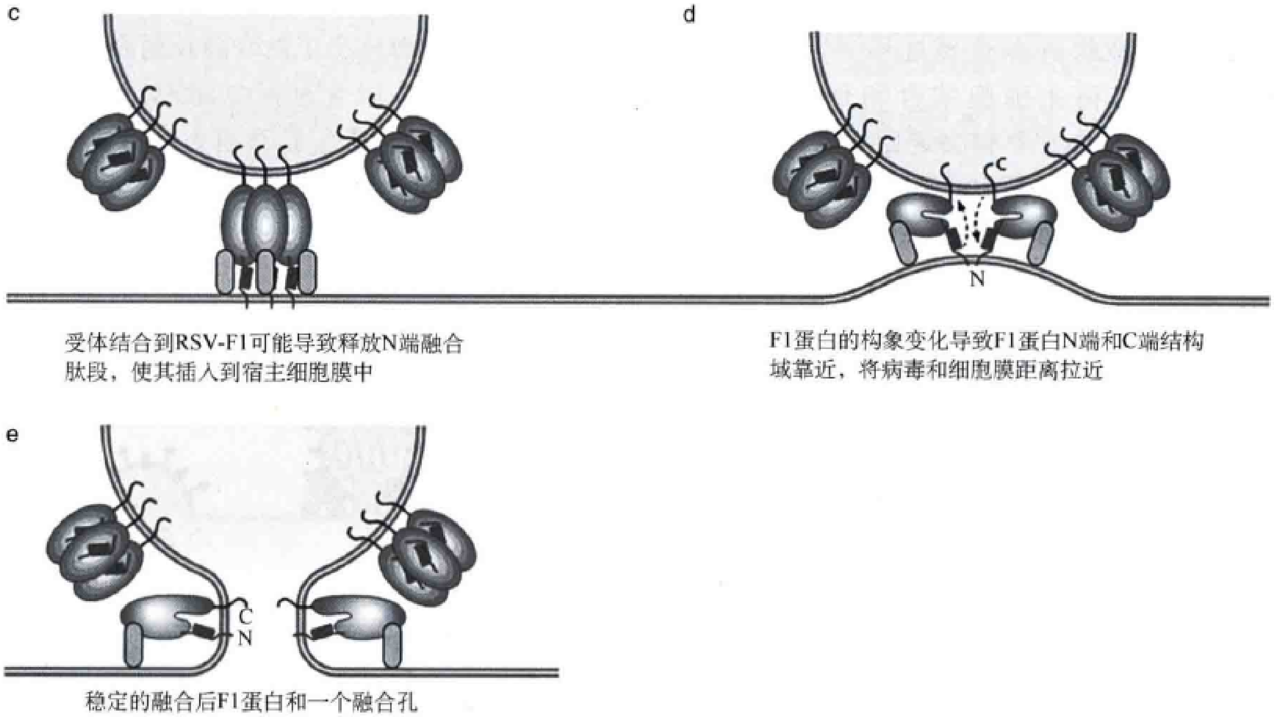


图 88-2(续) 引发融合肽段插入到宿主细胞膜上(c)，使病毒和宿主细胞膜紧密接触(d)，为了简化，图中仅仅绘制 2 个 RSV-F 单体。要想克服混合细胞膜的热力学壁垒，建立一个稳定的融合孔来输送病毒核衣壳，这需要多个 RSV-F 构象变化的组合力(e)。图片的转载经过 Griffiths 等许可[2]，见彩插

RSV 对于环境的变化非常敏感。55℃暴露 5 min 后，仅有 10% 的 RSV 具有感染性；室温 48 h 后，RSV 的感染性下降至 10%；4℃ 7 天后，仅剩下 1% RSV 具有感染性。每经过一次冻融后，RSV 的感染性滴度大约下降 90%[6-7]。乙醚、氯仿和多种去污剂(如 0.1% 的脱氧胆酸钠、十二烷基硫酸钠和 Triton X-100)均能迅速灭活 RSV。RSV 在环境中的生存能力部分取决于干燥时间和环境湿度[6-7]。将标本放置于乙醇-干冰混合浴中速冻，同时向冻存液中加入稳定剂(如甘油或蔗糖)，能增强 RSV 长期储存的效果。

(三)流行病学和传播

RSV 的传播主要通过飞沫，以及直接或间接接触感染者和(或)污染的表面[6-7]。在全球范围内，RSV 感染全年均可发生。在北半球的温带地区，RSV 感染主要在冬季发生，当年 12 月至次年 2 月间为感染高峰期。在南半球的温带地区，RSV 的感染高峰期主要在每年的 5～7 月；在部分(亚)热带地区(如中国台湾和中国香港，以及新加坡、马来西亚、哥伦比亚等)，每年可检测到两次 RSV 的感染高峰[11]。RSV 的流行病学数据显示：在同一地区同一呼吸道疾病流行季节，RSVA、RSVB 两型会交替流行；通常以 RSV A 一种型流行为主。但由于不同基因型 RSV 病毒株变异或新毒株产生，不同季节 RSV 的主导型会发生漂移[12-13]。

在美国，早期的研究估计每年大约有 10 万患者因 RSV 感染而住院治疗，病死人数也超过了 4500 人，为 RSV 感染住院的婴儿所支付的额外费用为 3 亿～6 亿美元[6]。全球范围内，RSV 是儿童急性下呼吸道感染和幼儿入院的主要原因，因而对医疗保健服务造成巨大负担[14]。针对 RSV A 型的特异性免疫保护的短暂性，可能是造成 RSV A 型患病率高于 RSV-B 型的原因[15]。事实上，所有儿童在 3 岁前都感染过 RSV，并且在他们的一生中，RSV 再感染是很普遍的。任何年龄阶段的人不会因为先前的感染，而对再次感染具有免疫[6]。

RSV 不但能引起严重的医疗保健相关或医院内感染，而且能引起儿童及成年人间广泛感染的暴发流行，这包括了医务人员的感染，他们感染后通常症状较轻仍继续工作(译者注：继而可能引起更广泛的医院内感染)[16-17]。在一个经典的实验中，研究人员发现：那些与 RSV 感染患儿密切接触的受试者比另一些与感染患儿保持 6 英尺以上(译者注：约 1.8 m)距离的受试者更易罹患 RSV 感染。这些情况表明：在 RSV 播散过程中，小颗

粒气溶胶的传染性要低于直接接触感染者分泌物或大颗粒气溶胶[6-7]。因此，在降低 RSV 的院内感染率方面，有针对的感控干预被认为是非常经济有效的措施[18-19]。对于 RSV 感染患者，当他们入院治疗时，应做好接触隔离措施[6,19]。

(四)临床意义

1. 儿童　RSV 是引起婴幼儿急性下呼吸道感染的最严重的病原体[14]。一项系统综述显示，该病在儿童中的潜伏期为 2～8 天，中位天数为 4.4 天[6-7]。常见的下呼吸道感染包括：支气管炎、细支气管炎和肺炎[14]。感染 RSV 的儿童多为没有其他基础疾病的健康儿童，常在感染后 8～15 天恢复[14]。Caserta 等[20]的研究开发了一个基于 9 个临床变量的通用呼吸道严重程度评分，可以作为关于疾病发病机制研究的终点，也可以用于治疗干预的预后评估。RSV 感染的危险因素包括：年龄＜2 岁和居住环境拥挤[14]。早产儿，以及合并慢性肺病、严重先天性心脏病，或严重免疫缺陷的婴儿感染 RSV 需住院治疗的风险最高。最近的一项关于全球儿童严重 RSV 疾病发病率及病死率的荟萃研究表明，绝大多数 RSV 相关疾病发生在一岁以前，特别是早产儿患者。这些数据证实了 RSV 感染是造成儿童入院的重要病因，和引起儿童死亡的重要因素，还进一步阐明了胎龄是疾病严重程度的重要决定因素。病例死亡率(case fatality ratios)的一个主要局限性是缺失了死亡患者的病例特征。此外，病例死亡率不能转化为基于人口的病死率[21]。

2. 成人　成人对于 RSV 不具有完全的免疫力，并可能会再次感染 RSV[15,22]。具有增高的 RSV 严重感染风险的成年人群主要包括，居住养老院或长期需要护理的居民、患心肺基础疾病的成人(如慢性阻塞性肺病、慢性心脏病和哮喘患者)、免疫功能不全的患者(包括肿瘤和移植患者)[22]。通过联合应用基于人群的前瞻性监测研究、需要医疗服务急性病的分析及大型医疗数据库的建模分析，确定了成人患者 RSV 的负担。2 项前瞻性监测研究中，针对健康老年人和有基础心肺疾病的高危成年人进行分析显示，其每年冬季 RSV 感染率分别为 3%～7%和 2%～10%[15,22]。

免疫功能不全成人 RSV 感染发病率和死亡率最高。造血干细胞移植(hematopoietic stem cell transplantation，HSCT)和实体器官移植后，RSV 的感染率为 1%～12%，其中的 18%～55%进展为下呼吸道感染(lower respiratory tract infection，LRTI)，其中的 7%～33%的患者因 RSV 感染而死亡[23-24]。30%～40%的患者在发病 7 天后会由上呼吸道症状进展为下呼吸道受累。高剂量全身放疗和淋巴细胞总数小于 100 个/mm^3 与由上呼吸道向下呼吸道 RSV 疾病进展相关，而血清中和抗体水平及皮质类固醇激素使用与之无关[24-25]。对于实体器官移植受体而言，有关 RSV 感染引发疾病的数据还非常有限。实体器官移植受者 RSV 感染发病率与风险低于 HSCT 受者。对于实体器官移植受者而言，绝大多数常见的 RSV 感染症状表现为发热、咳嗽、呼吸困难及并发症[6,24]。

3. 治疗与预防　RSV 的治疗具有挑战性。当前 FDA 所认可的、针对 RSV 感染的治疗和预防药物只有利巴韦林和帕利珠单抗(PVZ，Synagis)[26]。帕利珠单抗是一种针对融合后 F 蛋白中和表位的人源化单克隆抗体，可阻止 RSV 侵入宿主细胞发挥作用。在呼吸道感染流行季节为预防 RSV 感染，高危儿童应进行每月一次的预防性注射(5 剂方案)[26-27]。目前帕利珠单抗注射因其昂贵的价格而引发争议，几种近期帕利珠单抗的简化给药方案也被证明可达到与标准 5 剂方案等同的 RSV 感染保护效果[28-29]。利巴韦林是一种 RNA 病毒靶向的广谱核苷类似物，可以口服、静脉注射或雾化形式给药[30-31]。一项对儿童和成人的异体造血干细胞移植受者的大样本回顾性研究中的数据表明，在 RSV 引起的上呼吸道感染的早期，使用利巴韦林进行治疗可避免其进展为下呼吸道感染，降低随后的下呼吸道感染病死率[32]。在过去十年中，新型抗病毒药物包括单克隆抗体及核苷类似物显示出抗 RSV 的临床前景[2,30-31]。

虽然，在全球范围亟需 RSV 疫苗以预防小儿感染，但截至目前尚无一种安全、有效的 RSV 疫苗获得许可。最新最有前景的试验性疫苗策略是基于一个融合前 F 蛋白的构象类似物，该类似物可以诱导出活性最强的抗 RSV 中和抗体；据报道，该中和抗体活性可为帕利珠单抗的 10～100 倍[9,33]，其临床试验正在进行[33~34]。一个由诺华公司(Novavax)主导的Ⅱ期临床试验在 2016 年结束，该试验采用了重组 RSV-F 亚单位疫苗，该疫苗被报道可诱导出循环中的中和抗体[8,35]。

(五)标本的采集、运输和储存

与其他大多数通用的病毒样本采集要求一样,RSV 的标本采集也应遵守以下原则,以满足病毒检测和培养的要求:①采集标本应在发病的急性期进行;②保持复苏细胞的完整形态;③迅速将标本送至诊断实验室;④如果需暂时保存,应将标本及时冷藏;⑤如果用干冰保存,应将标本置于 O 型圈密封的冻存管内[7]。加热或冻融会降低标本中病毒载量。如果标本从采集到接收的时间可能预计会超过 2 h,那么应该将样本先保存在 4℃,并在相同的条件下转运到实验室,以提高 RSV 分离的效率。由于 RSV 很不稳定,理想情况下标本应该在收集后 4 h 内被运送至检测实验室,并接种到培养基上,因为在 4℃条件下保存时间过长会显著降低病毒滴度载量。或者,标本可采用速冻以防止病毒降解[36]。然而,不同类型的标本中 RSV 复苏的情况是不同的,如果采用敏感的核酸检测方法检测 RSV,那么对运输和储存温度的要求就没那么严格[7]。

用于 RSV 检测的合适的呼吸道标本可以反映 RSV 感染的部位。RSV 感染呼吸道上皮细胞,并能在潜伏 1～3 天后扩散至下呼吸道[6-7]。对于上呼吸道感染的检测,最佳的样本应包括鼻或鼻咽部灌洗液、吸出物和拭子[6-7]。对于快速抗原检测,鼻咽部吸出物或灌洗液相比鼻咽拭子和鼻部吸出物或灌洗液标本的敏感性略高,但系统综述和荟萃分析研究中提示其敏感性并无显著性差异[37]。用尼龙植绒拭子(如 Copan, Brescia, Italy)采集的鼻咽部标本不但含有更多上皮细胞,而且采集标本易于洗脱,同时采样造成患者的不适感最小,因而被广泛应用于快速抗原检测及核酸扩增试验(nucleic acid amplification tests, NAATs)[6, 38]。虽然,口咽拭子和唾液标本属于劣质标本,但当无法获得鼻或鼻咽部标本时,这些标本也可以被接受。对于下呼吸道感染的检测,可以收集支气管肺泡灌洗液、支气管冲洗液、痰和气管吸出物用于检测,其中与鼻腔灌洗液、鼻和咽拭子相比,支气管肺泡灌洗液标本的 RSV 检出率最高[7, 36]。气管吸出物和支气管肺泡灌洗液标本更适合于那些使用机械通气的免疫功能不全患者的检测[36]。

在患病初期数天内采集标本用于检测,这样会使确诊 RSV 为患者感染病原体的可能性最高。有 50%的患者在发病 1 周后,病毒培养或抗原检测结果转阴。然而,有文献记载那些免疫功能不全的婴儿患者在发病 3 周后仍会从呼吸道排出有活性病毒[6, 15]。当使用定量培养或实时荧光定量 PCR 检测病毒时,会发现上呼吸道(鼻腔吸出物)检出的病毒载量大约与下呼吸道相等[6-7, 39]。给健康的成人志愿者实验性接种 RSV,检测到排毒的平均持续时间为 7.4(±2.5)天,而对自然感染的老年人而言,排毒的平均天数为 10～13 天,也有排毒时间超过 20 天者[37, 40-41]。

(六)直接检测

1. 显微镜检查 虽然电子显微镜下可直接观察到 RSV,但它仅局限用于研究性实验室。尽管如此,在肺活检组织中检测出特征的合胞体性细胞病变效应(cytopathic effects, CPEs)是有助于诊断的。

2. 抗原检测

(1)快速抗原检测试验:RSV 快速抗原检测试验(rapid antigen detection tests, RADTs)的操作时间少于 30 min,并且不需要有经验的技术人员进行操作和判读结果[37, 42]。检测结果以颜色变化或固相膜上出现条带或标志的形式来判读,从而反映出抗原-抗体复合物的结合情况。绝大多数 RADTs 属于豁免测试(译者注:waived status 豁免状态,美国临床实验室改进修正案要求这类测试需要操作简单且错误率较低,可在 CLIA 监管下得到豁免批准),并用于即时检测[37, 42-43]。然而,这些方法的敏感性相对较低,并且很大程度上取决于 RSV 在社区人群中的发病率[4, 37]。因此,假阳性和假阴性结果的产生与是否在每年的 RSV 流行季节进行检测有很大关系,特别是在 RSV 的非流行季节,该方法的检测效能会大大减弱[44-45]。因此,推荐使用培养和 NAATs 对 RADTs 结果进行验证[4, 46-47]。最近的一项系统综述及荟萃分析研究表明,成人 RADTs 敏感性出乎意料的低,仅为 29%,而儿童总体敏感性为 81%[37]。考虑到 RADTs 在成人患者 RSV 检测中极低的敏感性,因此,其在成人群体中的应用非常受限,特别是老年和免疫功能不全患者[37]。

有一系列的商业化的 RSV 快速抗原检测试验平台或检测方法正在使用(表88-1)。影响选择的

表 88-1 商业化 RSV 及 HMPV 快速抗原检测[a]

病毒	产品	公司	适用样本	检测时间	厂商宣称的敏感性，特异性[b]	验证的敏感性，特异性[b]	注释	参考文献
RSV	Directigen EZ RSV	BD Diagnostic Systems, Sparks, MD	NPW、NPA 或 NPS	15min	89% 93%	59%～86.5% 92.3%～98%	使用特异性抗体以避免免疫球蛋白疗法带来的可能干扰	44，49
RSV	Veritor RSV	BD Diagnostic Systems, Sparks, MD	NPW 或 NPS	15min	88%～92% 95%～98%	59%～86.5% 97%～99%	基于设备的数字扫描，CLIA 豁免检测方法	43，46，48，49
RSV	Alere BinaxNOW RSV	Alere Scarborough, Inc. Scarborough, ME	NW 或 NPS	15min	89%～93% 93%～100%	89%～94.6% 88.5%～100%	CLIA 豁免检测方法	38，52
RSV	RSVAlert	SA Scientific, San Antonio, TX	NPW、NPA 或 NPS	15min	95.6% 94.1%	57%～97% 73%～100%	有效期 18 个月	
RSV	TruRSV	Meridian Bioscience, Inc., Cincinnati, OH	NPW、NPA 或 NPS	15min	71.7%～92.3% 81.1%～96.2%	不适用	两种单克隆抗体混合物，检测两种 RSV 抗原	
RSV	Clearview RSV	Alere Scarborough, Inc., Scarborough, ME	NPW、NPA 或 NPS	15min	93.7% 97.7%	不适用	CLIA 豁免检测方法，用于 6 岁以下儿童及 60 岁以上老人	
RSV	X/pect RSV	Remel, Inc., Kansas City, KS	NPW 或 NPS	15min	54.5%～100% 94.1%～100%	67%～78% 96%～98%	CLIA 豁免检测方法	
RSV	3M Rapid Detection RSV Test	3M Health Care, Saint Paul, MN	NW、NPA 或 NPS	15min	85.3%～88.2% 95.1%～97.4%	60%～87% 96%～99%	可以自动读取试验结果	
RSV	Sofia RSV	Quidel Corp., San Diego, CA	NW、NPA 或 NPS	15min	86%～89% 97%～98%	70% 97%～100%	基于设备的数字扫描，CLIA 豁免检测方法	38，48，49
RSV	RSV Respi-Strip/K-SeT	Coris BioConcept, Gembloux, Belgium	NPW 和(或)培养上清液	10 min	试纸条法 92.2%～96% 98.3%～100% K-SeT 法 92.2%～96% 98.3%～100%	不适用	快速，试验时间 10 min，全套取样设备	43
RSV	QuickVue RSV	Quidel Corp., San Diego, CA	NW、NPA 或 NPS	15 min	83%～99% 90%～92%	72.5% 97～100%	阴性结果无法排除 RSV 感染，应该加做培养或 NAAT 以确证	49
RSV 和 HMPV	mariPOC test	ArcDia International Oy Ltd., Turku, Finland	NPA 或 NPS	20min/2h	100%（RSV），～100%（HMPV）；均为 100%	89%(RSV)，50%(HMPV)；均为 100%	多种分析物即时抗原检测系统，同时检测 10 种病毒和肺炎链球菌	50，51

注：[a]NW. 鼻灌洗液，NPA. 鼻咽吸出物，NPS. 鼻咽部拭子，NPW. 鼻咽部灌洗液。[b]除非特别说明，均为与细胞培养法比较

关键因素包括测试的准确性、检验周转时间(turn-around time,TAT)、可接受的标本类型、可兼容的转运培养基和可靠的试剂或试剂盒供应。FDA最近批准了2种检测设备:BD Veritor RSV(Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ)和 Quidel Sofia RSV(Quidel Corporation, San Diego, CA),这2种设备采用了基于设备的数字扫描技术来自动化判读检测条带,提升了准确度[38, 48-49]。因其结果报告的客观性和无人值守检测的特性,使得 Sofia 和 Veritor 成为即时检测的首选。mariPOC(ArcDia International Oy Ltd., Turku, Finland)是全自动的随到随做(random access)的免疫分析系统,可以一次检测包括 RSV 在内的8种呼吸道病毒[50-51]。虽然不同快速抗原检测方法和采用不同类型标本进行检测的准确度相近[37],但因 Directigen 检测结果缺少客观性且 Quickvue 方法敏感性较低,进而降低它们在诊断试验中的使用价值[49]。

(2)直接荧光抗体检测:直接荧光抗体检测(direct fluorescent antibody,DFA)是基于对呼吸道样本 RSV 抗原的检测的方法,这种方法应用荧光基团标记的鼠源性的单克隆抗体进行测试。采用单抗检测可以极大地提高测试的敏感性和特异性(图 88-3)。有报道称,与培养法或 NAATs 相比较,DFA 的敏感性和特异性分别为 84%～100%和 86%～100%[44, 52-53]。目前,多个公司提供商业化的 RSVDFA 检测试剂(表 88-2)。DFA 检测的敏感性和特异性与细胞培养技术类似[54],而检测时限长于 RADT。DFA 的另一项优势在于其可以通过观察载玻片上的细胞的形态来评价标本的质量,但应注意到这种方法不但需要大量人工操作,而且还需要有经验的技术人员来完成[4, 37, 42]。同时检测多种常见呼吸道病毒(包括 RSV)的多重 DFA 检测试剂也已经上市[54]。

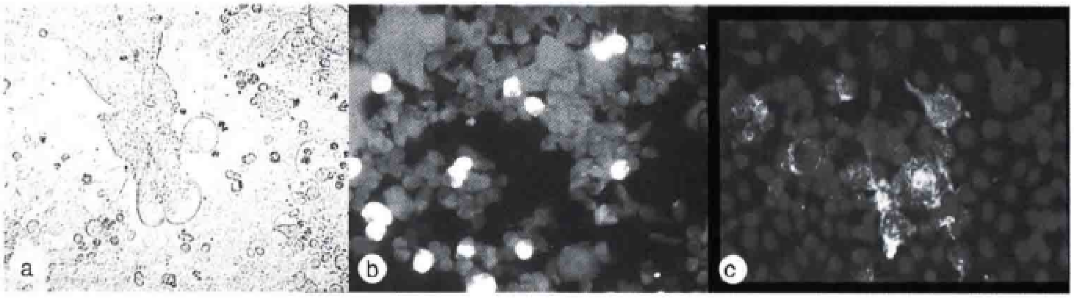


图 88-3 RSV 和 HMPV 的显微镜检测

注:a. RSV 感染的 HEp-2 细胞显示出融合细胞和大合胞体形成;b. 鼻咽部拭子标本的 RSV 直接荧光法检测;c. HMPV 感染的 LLC-MK2 离心培养物使用 MAb-8 单克隆抗体间接荧光法染色。图片来源:a 来源于 http://www.virology.org/hpphoto 3.html,b 和 c 由 David Ferguson 和 Marie Landry 提供,见彩插

3. 核酸检测 与传统的诊断方法相比,NAATs 可将 RSV 感染检测的敏感性提升至 93.5%～100%,特异性提升至近 100%(表 88-3)[39, 55]。选择 RSV 的 *N* 基因被作为核酸扩增的主要靶点的原因包括:①*N* 基因的核苷酸序列高度保守;②*N* 基因接近 *RSV* 基因组的 3′末端,是 *RSV* 基因转录和复制的起始部位,因此优先被转录[1]。目前已有多种不同的 RSV 核酸检测技术平台。以 PCR 技术为基础进行整合,衍生出了一步法、巢式、随到随做和单重或多重逆转录 PCR(RT-PCT),并利用这些技术对 RSV 核酸进行扩增[39,55-60]。其他一些非 PCR 扩增的检测方法也被应用于 RSV 的检测,包括核酸序列依赖性扩增[39, 55]、环介导等温扩增[61]、多重连接探针扩增[62]、逆转录链入侵扩增[63]及切口酶扩增反应[64]。新式检测方法在很短的检测时间内获得高敏感性和特异性的检测结果,因而有潜力完成 RSV 的即时检测[56, 59, 61, 63-64]。

目前已有多个用于症候群检测的多重分子诊断的商业化系统[39, 55, 65],其中一些已通过了美国 FDA 认证以用于检测包含 RSV 的多种呼吸道病毒及细菌病原体(表 88-3)。最近的是 Luminex Molecular Diagnostic 公司(Austin,TX)的 xTAG 呼吸道病毒组合测试卡,BioFire Diagnostics 公司(Salt Lake City,UT)的 FilmArray 呼吸道组合测试卡,和GenMark Diagnostic公司(Pasadena,CA)

表 88-2 主要的商业化的 RSV 快速抗原检测试剂及其检测性能

病毒	产品名称	制造商	厂商宣称的产品表现[a]	应用范围	说明及参考文献
RSV	BartelsRSVDFA	Trinity Biotech, Jameston, NY	敏感性 88%～100%;特异性 100%	标本直接检测或病毒培养物验证	单试剂或双试剂 DFA;最近 Trinity Biotech 公司收购[44]
RSV	Light Diagnostics Respiratory Viral Panel DFA	Millipore, Temecula, CA	敏感性 100%;特异性 86%	标本直接检测或病毒培养物验证	单独检测 RSV,或组合测试形式;可以覆盖 RSV、甲/乙型流感、腺病毒、副流感病毒 1-3
RSV	SimulFluor Respiratory Screen, RSV/flu A or RSV/Para 3	Millipore, Temecula, CA	敏感性 83.3%～100%;特异性 83.8%～100%	筛查临床标本或病毒培养物	三种组合形式可选;覆盖 RSV、甲/乙型流感、腺病毒、副流感病毒 1-3[53-54]
RSV	D^3 Ultra DFA Respiratory Kit	Quidel, San Diego, CA	敏感性 93%;特异性 99%	标本直接检测或病毒培养物验证	覆盖甲/乙型流感、RSV、副流感病毒 1-3、腺病毒
RSV	Imagen RSV	Oxoid Ltd., Hampshire, United Kingdom	敏感性 93%;特异性 98%	人体临床标本检测或鉴定	3 种单抗混合物,覆盖 RSV、甲/乙型流感[79]
RSV	PathoDx RSV and Respiratory Virus Panel	Remel, Inc., Lenexa, KS	敏感性 77.6%～100%;特异性 98%～100%	临床标本检测或病毒培养物验证	呼吸病原体试剂盒覆盖 RSV、甲/乙型流感、腺病毒、副流感病毒 1-3
HMPV	D^3 Ultra DFA HMPV Kit	DHI/Quidel, Athens, OH	敏感性 62.5%;特异性 99.8%	标本直接检测或病毒培养物验证	以病毒培养和 NAAT 作为参考方法[44,157]
HMPV	Imagen hMPV DFAtest	Thermo Fisher Scientific, Ely, United Kingdom	敏感性 63.2%;特异性 100.0%	临床标本检测	敏感性/特异度的计算以病毒培养和作为 NAAT 为参考方法[44]
HMPV	Light Diagnostics HMPV Reagent	Millipore, Temecula, CA	未完成	标本直接检测或病毒培养物验证	Millipore 提供的分析物特异性试剂[134]

注:[a] 如无特殊说明,均与病毒培养比较。许多情况下,病毒培养并非比较病毒检测效果最优方法,因此快速抗原检测法的敏感性/特异性可能看上去比实际高一些。同时需要注意,实验室之间的检测性能可能存在差异

表 88-3 检测和鉴定 RSV 和 HMPV 的商业化 NAATs

病毒	试剂盒	制造商	方法	其他靶点[a]	敏感性(%)	特异性(%)	参考文献
RSV	Alere i RSV[b]	Alere Scarborough, Inc., Scarborough, ME	RNA 提取 恒温扩增	无	98.0～98.6	97.8～98.6	64
RSV	Xpert Xpress Flu/RSV; Flu/RSV XC	Cepheid, Sunnyvale, CA	RNA 提取 Real-time PCR	Flu A, Flu B	97.8～100	100	56, 59, 60
RSV	Prodesse ProFlu+	Hologic, Inc., Marlborough, MA	RNA 提取 Real-time PCR	Flu A, Flu B	95～100	97～99	158
RSV	Simplexa Flu A/B & RSV 常规法和直接法	Focus Diagnostics, Cypress, CA	RNA 提取(直接法:样品加热) Real-time PCR	Flu A, Flu B	91～95	100	158～160
RSV	ARIES Flu A/B and RSVAssay	Luminex Molecular Diagnostics, Austin, TX	RNA 提取 Real-time PCR	Flu A, Flu B	96.0～98.0	98.4～100	58, 59
RSV	Nanosphere Verigene RV+	Luminex Molecular Diagnostics, Austin, TX	一体化的核酸提取和纳米颗粒技术	Flu A, Flu B	100	99	159
RSV	cobas Liat Influenza A/B and RSV Assay[b]	Roche Molecular Diagnostics, Pleasanton, CA	一体化 Real-time PCR 即时检测	Flu A, Flu B	97.8～100	98.4～100	57, 59
HMPV	Pro hMPV	Gen-Probe, San Diego, CA	RNA 提取 Real-time PCR	Flu A, Flu B	100	100	161
HMPV	Quidel Molecular hMPV Assay	Quidel Molecular, San Diego, CA	RNA 提取 Real-time PCR	None	95.2	99.8	
RSV 和 HMPV	Lyra RSV + hMPV Assay	Quidel Molecular, San Diego, CA	RNA 提取 Real-time PCR	None	95.7～96.5	98.0～98.3	
RSV 和 HMPV	xTAG Respiratory Viral Panel	Luminex Molecular Diagnostics	RNA 提取 PCR 和 RT-PCR xMAP 悬浮芯片	Flu A, Flu B, PIV1-4, AdV, EnV/RhV, CoV	RSV, 100; HMPV, 96	RSV, 97.4～98.4; HMPV, 98.8	66

（续 表）

病毒	试剂盒	制造商	方法	其他靶点[a]	敏感性(%)	特异性(%)	参考文献
RSV 和 HMPV	xTAG Respiratory Viral Panel Fast	Luminex Molecular Diagnostics, Austin, TX	RNA 提取 PCR 和 RT-PCR xMAP 悬浮芯片	Flu A, Flu B, PIV1-4, AdV, EnV/RhV, CoV, Boca	RSV, 96.6; HMPV, 100	RSV, 100, HMPV, 100	71
RSV 和 HMPV	NxTAG Respiratory Pathogen Panel	Luminex Molecular Diagnostics, Austin, TX	RNA 提取 PCR 和 RT-PCR xMAP 悬浮芯片	Flu A, Flu B, PIV1-4, AdV, EnV/RhV, CoV, Boca, 肺炎衣原体, 肺炎支原体	RSV, 98.5～100; HMPV, 93.8	RSV, 99.3～99.4; HMPV, 99.1	69
RSV 和 HMPV	FilmArray Respiratory Panel[c]	BioFire Diagnostics, Salt Lake City, UT	一体化核酸提取、巢式 PCR 和熔解曲线分析	Flu A, Flu B, PIV1-4, AdV, EnV/RhV, CoV, 肺炎衣原体, 百日咳鲍特菌, 肺炎支原体	RSVA, 86.4; RSVB, 100; HMPV, 96.2	RSVA, 100; RSVB, 100; HMPV, 100	68
RSV 和 HMPV	FilmArray Respiratory Panel 2	BioFire Diagnostics, Salt Lake City, UT	一体化核酸提取、巢式 PCR 和熔解曲线分析	Flu A, Flu B, PIV1-4, AdV, EnV/RhV, CoV, 肺炎衣原体, 百日咳鲍特菌, 肺炎支原体	RSV, 99.4; HMPV, 97.3	RSV, 98.3; HMPV, 99.5	
RSV 和 HMPV	eSensor XT-8 Respiratory Viral Panel	GenMark Diagnostics, Pasadena, CA	RNA 提取 PCR 和 RT-PCR 电化学检测	Flu A, Flu B, PIV1-3, AdV, RhV	RSVA, 100; RSVB, 95.8; HMPV, 92	RSVA, 100; RSVB, 100; HMPV, 100	67, 73
RSV 和 HMPV	ePlex Respiratory Panel	GenMark Diagnostics, Pasadena, CA	一体化核酸提取、DNA 竞争性杂交和电化学检测	Flu A, Flu B, PIV1-4, AdV, EnV/RhV, CoV, 肺炎衣原体, 肺炎支原体	RSV, 92.6～100; HMPV, 71.4～90.0	RSV, 100; HMPV, 100	162, 163
RSV 和 HMPV	Nanosphere Verigene RP Flex	Luminex Molecular Diagnostics, Austin, TX	一体化的核酸提取和纳米颗粒技术	Flu A, Flu B, PIV1-4, AdV, RhV, 百日咳鲍特菌, 副百日咳鲍特菌, 支气管鲍特菌, 霍氏鲍特菌	RSV, 96～100; HMPV, 97.3	RSV, 98.9～99.8; HMPV, 97.7	62
RSV 和 HMPV	Anyplex II	Seegen Inc., Seoul, South Korea	RNA 提取 PCR 和多重 real-time PCR	Flu A, Flu B, PIV1-4, AdV, EnV/RhV, CoV, Boca	RSVA, 100; RSVB, 90.6; HMPV, 88.9	RSVA, 100; RSVB, 99.2; HMPV, 99.2	164

注：[a] AdV. 腺病毒；Boca. 博卡病毒；CoV. 冠状病毒；EnV/RhV. 肠道病毒/鼻病毒；PIV. 副流感病毒。[b] CLIA 豁免检测方法。[c] EZ 组合测试试剂盒（译者注：即 Respiratory EZ Panel）是 CLIA 豁免检测方法

的 eSensor XT-8 呼吸道病毒组合测试卡[66-69]。虽然,当前仅有鼻咽拭子这唯一标本类型经 FDA 批准用于绝大多数 NAATs 检测 RSV,但多数已发表的报道和分析显示,其他呼吸道样本,包括鼻拭子和支气管肺泡灌洗液检测的敏感性和特异性与鼻咽拭子相似[70-71]。此外,也有大量仅供研究使用的检测和分析物特异性试剂(analyte-specific reagents, ASR)可用于 RSV 的检测。快速的检测报告时限,多种病原体的同时检测及对于多重症候群组合测试的高敏感性,可能会缩短患者在急诊科的滞留时间,减少诊断检测,并缩短静脉应用抗生素的时间[72-75]。

(七)分离程序

通过细胞培养从呼吸道分泌物中分离病毒具有极佳的特异性,此方法至今仍是 RSV 诊断的金标准。此外,不同于 NAATs,病毒培养法不受扩增靶点基因突变的影响,因为这些基因突变可能会造成 NAATs 出现假阴性的结果[76],并且大多数类型的标本均适宜进行培养[47]。但是,由于 RSV 不稳定的特性,病毒培养已不再是最敏感和最可靠的诊断 RSV 感染的方法。

对于 RSV 原代培养,通常首选人类非整倍体的细胞,如 HEp-2。选择其他的细胞系用于培养,例如人肾细胞、羊膜细胞和二倍体成纤维细胞和猴肾细胞进行培养,其检测的敏感性会降低[1,5-6]。细胞系培养 3~7 天后,培养的细胞可出现特征性的合胞体化的 CPE(图 88-3)。然而,合胞体形成的程度取决于培养细胞的类型、单层细胞的融合度、培养基、病毒株种类与型别、感染复数及 RSV 是否适应实验室培养的条件。在 HEp-2 细胞中,RSV 斑块形态与 RSV 感染儿童的疾病严重程度无关[5]。报道称利用常规试管细胞培养法后检出 RSV 的敏感性差异很大,57%~90%不等。造成这种差异部分原因是:①病毒生存能力的减弱;②需要有经验的技术人员;③实验室所使用的细胞系不同[1,6]。

"壳瓶培养法(shell vial assay)"可将病毒检出所需的时间极大地缩短至 16 h 左右,这种方法结合了离心和免疫荧光的方法,可以在 CPEs 形成之前检测感染细胞中病毒抗原的表达情况[6,47]。R-Mix 培养法(Diagnostic Hybrids/Quidel Corp, Inc., Athens, OH)是一种快速、敏感的检测和鉴定呼吸道病毒的方法,该法将人类肺癌 A549 细胞和水貂肺细胞 Mv1Lu 细胞进行混合培养[77-78]。与传统的培养方法相比,该法可明显减少培养的成本。采用 R-Mix 培养法比在传统方法条件下利用 RMK、HEp-2 和 MRC-5 细胞系培养更敏感,且培养时间也可缩短数天[77]。对于 RSV 和其他呼吸道病毒而言,过夜培养后筛选 R-Mix 细胞更具敏感性,得到的结果更为即时且相比直接抗原检测也更可靠[78-79]。除此之外,R-Mix 细胞培养的主要优势在于可鉴定那些无法被直接染色检测的病毒[46,77]。

(八)鉴定

在 RSV 的流行季,如果细胞培养出现特征性的合胞体样 CPEs,且红细胞吸附试验阴性,就可说明存在 RSV 感染。但是,因其他呼吸道病毒,如 3 型副流感病毒和麻疹病毒也可以在一些特定的细胞系中产生类似合 RSV 的 CPEs。因此临床病毒实验室在确认 RSV 感染时,还需对培养瓶中的感染细胞进行病毒型别特异的免疫荧光检测(IFA)作为标准的检测方法[47]。

(九)分型系统

由于 RSV 的 A 型和 B 型感染后,患者能产生不同临床表现和结局,确定病毒型别信息会对临床患者的管理十分有益,特别是当型特异性疫苗和治疗被研发出来后[6,15]。通常情况下,RSV 的型别信息广泛应用于推进流行病学调查工作[80]。一些商业化的分子诊断测试在检测病毒的同时,也可以同时对 RSV 的 A、B 两型进行分型(表 88-3)。

常用的 RSV 分型方法包括:限制性片段长度多态性、Sanger 测序、下一代测序、G 蛋白的异源双链核酸分子迁移分析[1-2,16-17]。到目前为止,已鉴定出超过 100 个基因型的 RSV 毒株,包括 A 群(即 GA2、GA5 和 GA7 等)和 B 群(即 GB3 和 GB4 等)[1,81-82]。这些高分辨率的分型技术可能有助于监测可能出现的医疗保健相关 RSV 感染并阻断疫情的暴发[16-17,81]。

(十)血清学试验

血清学的方法一般只用于 RSV 感染的流行病学研究而非临床诊断。大多数 2 岁的儿童都具

有RSV感染的血清学证据。而相当一部分(10%～30%)既往RSV感染的婴幼儿，血清学呈阴性反应，这可能由于婴儿免疫应答尚不成熟[6]。此外，利用检测RSV的IgM抗体来诊断感染的敏感性很低，特别是针对6个月以下的婴儿时，该方法无法在特定的临床时间窗内对疾病做出明确的诊断[6,83]。然而，RSV感染的血清学主要用于老年患者，他们对RSV的抗体反应最强[6]。当前针对RSV感染的血清学诊断的方法主要包括IFA、酶联免疫法、补体结合试验和中和试验。

(十一)抗病毒药物敏感性试验

在临床诊治过程中，还未出现RSV对利巴韦林产生耐药的情况。截至目前，在每月接受帕利珠单抗注射的儿童体内分离出了一些帕利珠单抗耐药的RSV突变毒株[84-85]。有报道显示帕利珠单抗耐药株出现F蛋白的K272E及S275F位点突变。突变导致了RSVF蛋白上的帕利珠单抗结合位点的氨基酸替换，与接受帕利珠单抗治疗患者的RSV突破性感染相关。一个近期的研究报道显示，在39例儿童中发现了4例(10.2%)出现帕利珠单抗耐药突变，其中1例有接受帕利珠单抗治疗的记录[85]。表达RSVF蛋白的细胞融合试验被报道用于研究帕利珠单抗耐药株的突变[86]。

(十二)结果的评价、解释和报告

通常可基于社区RSV流行季背景，对幼儿的RSV感染进行临床诊断，而这些表现在成人中的特异性较低，通常不会怀疑RSV感染。检测结果的解读应该结合RSV感染自然历史和患者临床表现及既往病史。血清学结果几乎没有临床价值，而快速抗原检测、DFA和基于NAATs的分子生物检测可作为首选的实验室诊断方法。RSV细胞培养耗时较长，报告时限较长，一般用作快速抗原检测结果为阴性标本的备选检测试验，由于这些标本类型未经验证或批准用于基于NAATs的分子生物检测，或需要进一步鉴定时才使用该方法。

快速抗原检测可将检验报告时限缩短至15 min，可使临床医生能及时获得检测结果。但是，由于其相对低的敏感性，可能会出现假阴性结果，不应将其解释为排除RSV感染可能性。因此，为了提高检测效能，DFA、培养及RT-PCR应该作为快速抗原检测的补充。NAATs特别适用于检测成年患者的呼吸道标本和用于RSV感染的非流行季节。越来越多的经FDA批准的多重分子生物检测可同时检测和鉴定包含RSV在内的常见病毒性病原体，该方法正在成为RSV检测和分型的的主要工具。快速、即时的检测在未来有可能减少患者在急诊治疗时间，减少诊断检测和患者花费，并改善患者医疗照护。值得一提的是，Alere i RSV，cobas Liat Influenza A/B和FilmArray Respiratory Panel EZ这3种检测现在已通过CLIA豁免批准。鉴于目前多重实时NAATs是定性检测，而荧光实时定量NAATs能估测病毒载量。特别是当检出多种病毒时，病毒载量信息可以帮助人们确定最优势的感染病原体。病毒载量估测也可能帮助我们确定RSV的清除率，这对那些免疫功能不全患者或移植前的患者而言是至关重要的，根据RSV清除率的情况而考虑需要进一步的治疗或推迟移植手术。

由于受不同人群和特定季节的发病率影响，这些检测方法的阳性和阴性预测值会产生较大的变化。若要使RSV感染诊断的结果合理准确，就应将在流行季节婴儿下呼吸道感染的临床和流行病学表现进行综合分析。为患者提供高质量医疗照护，就需要医生和实验室工作人员间能有效地进行相关信息的交流。RSV病毒相当脆弱，所以即使对于最敏感的检测方法(如RT-PCR)，不恰当的标本采集、转运和处理，也可能会导致产生假阴性结果。因此，正确的标本采集和快速转运的重要性是不容忽视的。及时报告检测结果可以帮助临床医生尽早停止不必要的治疗或实施感染预防措施，以防止院内感染的扩散。

二、人类偏肺病毒

(一)分类学

人类偏肺病毒(human metapneumovirus，HMPV)属于单股负链病毒目(*Mononegavirales*)、肺炎病毒科(*Pneumoviridae*)、偏肺病毒属(*Metapneumovirus*)[87-88]。正肺病毒属(*Orthopneumovirus*)是肺炎病毒科中的另一个属，包括与人类相关的RSV。HMPV是偏肺病毒属中唯一与人类相关的病原体，此外，偏肺病毒属还包括

禽类偏肺病毒(avian metapneumovirus,AMPV),也被称为火鸡鼻气管炎病毒(turkey rhinotracheitis virus),可以引起火鸡、鸭和鸡的呼吸道感染[87]。

(二)病原体描述

HMPV在2001年首次从荷兰1例小于5岁的感染儿童的鼻咽吸出物中分离得到,在猴肾细胞中进行病毒培养时会形成和RSV难以区分的CPEs[89]。进一步的研究显示这种病毒不同于RSV,在分类上与AMPV最靠近。

HMPV是含有包膜的呼吸道病毒,其含有一个单股负链非节段RNA基因组,且呈现为多形性颗粒状,大小为150～600 nm[90]。*HMPV*基因组包括8种基因,基因组含有13 280～13 278个碱基,编码9种蛋白。与RSV等其他肺炎病毒科病毒不同,HMPV和AMPV缺乏非结构蛋白NS1和NS2的编码基因,并且其*RNA*基因组中的基因序列与RSV不同(图88-1)[90]。与RSV类似,核蛋白(N)基因的核酸序列具有高度的保守性。在HMPV感染细胞时,核蛋白(N)和磷酸化蛋白(P)相互作用并且共同参与HMPV感染的细胞质病毒包涵体的形成。融合蛋白(F)能通过与宿主细胞上的硫酸肝素结合诱导病毒与细胞的融合,并利用多个精氨酸-甘氨酸-天门冬氨酸(Arg-Gly-Asp)结合的整合素(Integrin)作为受体来黏附并侵入宿主细胞[91]。糖基化蛋白(G)是HMPV分离株中变异性最大的蛋白,它能结合宿主细胞的粘多糖,包括硫酸肝素样分子[92]。

HMPV毒株间存在基因和抗原的差异;根据F和G基因序列,HMPV可被分为A、B两个基因型,而每个基因型又分为5个亚系(sublineage)(A1、A2a、A2b、B1和B2)[89-90],其中A2亚系的基因多态性最大[93-95]。最近一项马来西亚的研究报道了一种先前未识别出的全新A2亚系,与其他南亚国家分离的病毒株共同聚集在这个新进化枝中[96]。

(三)流行病学和传播

自2001年被发现起,HMPV在全球各年龄组人群中均有报道。血清学试验显示几乎所有的5岁之前的儿童都感染过该病毒[89]。一项针对美国3个县2003－2009年急性呼吸道疾病或发热住院和门诊儿童的基于人群前瞻性监测研究显示,HMPV感染造成了住院的重大负担[97]。有大约7%的有症状儿童罹患了HMPV,在无症状儿童中也有1%患感染HMPV;HMPV感染与5岁以内儿童门诊到访次数增加密切相关,特别是在1岁以内[97]。一项针对西班牙2005－2014年14岁以下无症状住院儿童的前瞻性研究显示,5.5%患儿罹患HMPV感染[98];另一项针对美国2003－2009年5～13岁因急性呼吸道疾病就诊的门急诊患儿的研究也显示,大约5%的儿童有HMPV感染[99],两项研究的HMPV感染率较为相似。

虽然长期的研究发现全年都有散发HMPV感染,但HMPV的发病具有季节性。在温带国家,冬、春季是HMPV发病的高峰期,它每年的流行季与RSV的流行季存在部分或者全部重叠[97]。在热带地区,HMPV的流行期通常和雨季重合,每年夏末11月至次年早春4月高发,3月达到发病高峰[96,100]。

许多纵向研究表明,A、B群血清型的HMPV毒株可以在同一地域同一流行季节内共同流行,又会在某一年内以某一型占主导[93-96,100]。抗原的变异被认为是造成HMPV在患者一生内重复感染的原因,这也给疫苗的研发带来了挑战[93-95]。

目前尚未有关于HMPV传播途径的报道,但一些专家认为病毒通过亲密或直接接触感染性分泌物进行传播,这些分泌物主要包括大颗粒气溶胶、飞沫和被病毒污染的环境表面[90]。一般认为感染后5～6天患者最具传染性,此时容易造成HMPV传播[101-102]。近期一种新的联合生物信息学和F、G基因序列分析方法,研究了HMPV在儿童和成人门诊患者中的动态传播模式[96]。利用这一方法,研究人员能够推算出7天以内的所属同一感染群体的患者的可能感染时间,并识别出病毒的传播者和受感染者[96]。

(四)临床意义

人类是HMPV唯一的传染源。HMPV感染潜伏期通常认为是4～6天,中位天数为5天[101-102]。HMPV感染的临床症状和体征是非特异的,很难与其他导致呼吸道感染的病毒相区分。检测到HMPV与感染患者出现的临床症状之间存在强相关性,原发感染4周之后仍然可以排毒[103-104]。HMPV感染导致的疾病谱很广,从普

通感冒到下呼吸道感染均有可能，如细支气管炎、肺炎、哮吼(croup，喉头炎)和反应性气道疾病急性加重[105]。研究发现HMPV感染确诊患者最常见的临床症状包括咳嗽、鼻塞和流涕[105-106]；在老年人中通常出现呼吸困难和喘息[106-107]，而孕妇和免疫功能不全患者中常出现发热[108-109]。

关于RSV和HMPV共感染的病例已有报道，假如两种病毒流行季发生重叠时，出现这种情况并不令人惊奇。与细菌共感染并不多见，除非是中耳炎的并发症，这种疾病比较容易出现共感染的情况[97]。与RSV感染相似，婴儿和其他特殊人群包括免疫功能不全的患者、高风险人群或老年人，罹患HMPV感染的发病率增高。大约一半下呼吸道感染(lower respiratory tract infection，LRTI)的儿童病例起病于他们出生后的前6个月内，这表明年龄过小是引发严重疾病的一个主要的危险因素[97]。老年人和免疫功能不全患者在罹患HMPV感染后也容易进展至LRTI合并症。在一项罹患HMPV感染的免疫功能不全患儿的队列研究中，29%小儿发生LRTI，23%进入重症监护病房或需要吸氧，大约5%死于HMPV肺炎[110]。一项类似的研究发现，患儿LRTI的发生率可高达51%，呼吸衰竭和死亡的发生率分别为15%和10%，并且细菌、真菌共感染是患儿死亡的主要危险因素[111]。

据报道在患有肿瘤的成年患者中，HMPV感染并发症多种多样。在一项研究中，患者进展为LRTI与血液系统恶性肿瘤基础病、医疗保健相关感染、发病时有低氧血症独立相关，并且出现LRTI的患者30天死亡率高达10%，而仅有上呼吸道感染的患者30天死亡率为0[108]。在另一项研究中，虽然有55%的肿瘤患者检测出HMPV感染，且影像学上提示异常，但也没有死亡病例报道，即使这些患者中包含HSCT受者[112]。

对于接受实体器官移植的受者而言，50% HMPV所致上呼吸道感染患者会发展为LRTI，进展为LRTI的中位时间是7天(范围2～31天)。在这个队列中，患者进展为LRTI的危险因素包括诊断上呼吸道感染时出现淋巴细胞计数降低、C反应蛋白水平升高。在这个队列中其他病毒或细菌的共感染常见，39%的患者有类似情况[113]。

HMPV感染后的罕见并发症有脑炎、脑膜炎(在既往健康的儿童和成人中均有报道)[114-115]和心肌炎(在成人中有报道)[116-117]。在所有的病例中，患者恢复后均未遗留神经系统或其他后遗症。

目前尚无获批的用于治疗HMPV的抗病毒药物上市[118]。大多数免疫功能正常的儿童和成人感染HMPV后，经过支持治疗后病情可被控制。对于那些免疫功能不全的患者，有报道使用利巴韦林(经批准可用于治疗RSV感染的核苷类似物)、静脉人免疫球蛋白或两者的联合应用治疗HMPV感染，但上述治疗方法效果尚不确切，仍需要进一步评估[110-119]。

尽管人们通过多种途径研制针对HMPV感染的疫苗，但目前尚无一例研制成功[120]。在一项研究中，一种基于野生型HMPV的重组病毒可以在35%接种的健康成人中诱导产生抗体反应，目前认为其可以作为合适的亲代病毒，基于该病毒研发HMPV重组减毒活疫苗[121]。但在最近的一项Ⅰ期临床试验中，无论在成人还是HMPV血清学阳性和阴性的儿童中，HMPV重组减毒活疫苗接种后的反应都很弱[122]。因此，HMPV疫苗的研发还有很长的路要走。

HMPV感染后的排毒期可长达几天到几周时间，提示HMPV是潜在的院内感染病原体。在肿瘤患者中，通过PCR方法检测到HMPV感染后中位排毒时间是14天，尽管有报道称一个1岁半的前B细胞急性淋巴细胞白血病患儿的排毒时间长达80天[112-113]。有关于住院儿童和成人HMPV院内感染的报道，接触隔离和医务工作者进行充分的手卫生是阻止HMPV在院内播散的必要预防措施[92,124-127]。医疗机构应该对HMPV的院内感染增强警惕，特别是针对那些潜在的具有高并发症风险的人群[125]。

(五)标本的采集、运输和储存

鼻咽拭子是最常用的检测和培养HMPV的标本类型。植绒拭子采集的鼻咽部标本正逐渐替代吸出物标本，这种方法并未显著地降低诊断阳性率[128]。其他用于HMPV上呼吸道感染检测诊断的标本包括鼻腔灌洗液和鼻咽吸出物，该方法主要用于婴儿。通常情况下，使用10F口径的导尿管对婴儿的鼻咽吸出物进行采集。比起收集杯(collection trap)单独收集的标本，采样后对导尿管进行清洗并通过收集杯收集，这样合并的杯中分泌物能够提高采集量[129]。对于HMPV所致

LRTI的检测主要依靠咳出痰、诱导痰、支气管冲洗液、支气管肺泡灌洗液标本。标本运输主要使用标准的病毒转运培养基。标本在采集之后应尽快被处理，在4 ℃条件保存时间不能长于72 h，以免影响检测结果。37℃会导致病毒滴度迅速下降[130]。标本的长期保存或实验室留存，应置于O型圈密封的冻存管内，首选−70 ℃进行冻存。

(六)直接检测

1. 显微镜检查 HMPV病毒感染培养细胞的上清液中可以用电子显微镜检出病毒颗粒[89,131]。最初发现HMPV时即采用这种检测方法[89]，不过，由于其敏感性不够、耗费时间、重复性不好，因此不作为临床诊断的常规试验方法。

2. 抗原检测 目前已有一种自动多重即时抗原检测mariPOC Respitest(ArcDia Inc.，Turku，Finland)在欧洲上市，用于鼻咽吸出物和鼻咽拭子标本中HMPV抗原检测[50](表88-1)。除HMPV外，该系统还可同时检测多种呼吸道病原体，包括甲型流感病毒、乙型流感病毒、RSV、腺病毒、副流感病毒1～3型和肺炎链球菌，初步检测结果在20 min内即可获得。以NAATs作为参比方法，mariPOC测试的敏感性和特异性在不同研究之间高低不一。在其中一项研究中，针对有呼吸系统症状和(或)发热的儿童采集的咽拭子标本，mariPOC法检测HMPV的敏感性为50%，特异性为100%[50]；而另一项研究中，敏感性和特异性分别为77.8%和100%[132]。

目前，已有很多市售的DFA试剂使用HMPV特异的小鼠源性单克隆抗体染色，用来检测鼻咽标本的HMPV抗原(表88-2)。有一项研究比较了4种HMPV检测试剂盒在鼻咽吸出物标本中的检测效果[133]。2种DFA试剂盒，Anti-human*Metapneumovirus*(Argene，Verniolle，France)和Imagen hMPV(Oxoid，Thermo FisherInc.，United Kingdom)在阴性样本和其他病毒(如RSV和腺病毒)标本中能检测到非特异阳性信号。经评估，与RT-PCR法相比，另外两种试剂盒D^3*Ultra* DFA HMPV(Diagnostic Hybrids Inc./QuidelCorp，Athens，OH)和Light Diagnostics HMPV DFA Reagent(Millipore，Temecula，CA)的敏感性较低(50%)但特异性较高(100%)。在其他研究中，当使用大量HMPV阳性标本评估时，Light Diagnostics HMPV DFA试剂的敏感性(85.4%)较高[134]，而Imagen HMPV的敏感性仍然只有63.2%[44]。

虽然抗原检测的敏感性总体低于分子生物学检测，但是由于抗原检测相对操作简便且成本低、特异性高、报告周期短，使得其一直被应用在病毒学诊断中。病原学检测通常与分子生物学检测联合用于两步筛查程序中，所有样本首先通过抗原检测进行快速筛查，所有的阴性样本再用分子生物学方法进行检测。

3. 核酸检测 到目前为止，RT-PCR是临床上所使用的最为敏感的HMPV检测方法。一些针对HMPV的NAATs和分析物特异性试剂(ASR)已经实现了商业化，例如，NucliSENS EasyQ HMPV(bioMérieux，Durham，NC)、MGB Alert HMPV Detection Reagent ASR(Nanogen，San Diego，CA)、Quidel Molecular RSV＋HMPV Assay(Quidel Corp.，San Diego，CA)和Pro HMPVAssay(GenProbeInc，San Diego，CA)，这些检测方法的性能特征的比较见表88-3。

核酸扩增和鉴定技术的最新进展推动了分子检测系统的研发，可同时检测和区分多种包括HMPV在内的多种呼吸道病毒。其中大部分设备是以HMPV的高度保守的N基因和F基因为靶标进行检测的。目前已有数个检测设备和多重分子检测组合测试卡获得了FDA审批可以应用于检测鼻咽拭子样本中的呼吸道病毒，也有一部分组合测试获得了欧洲的CE认证(表88-3)。这些组合测试和设备在检测的多重范围、操作复杂程度、通量和检测时间上均有所不同[135]。由于敏感性比病毒培养和抗原检测更高，NAATs通常被认为是包括HMPV在内的许多病毒检测的“金标准”，并在许多实验室中被广泛应用。总体而言，HMPV检测的敏感性和特异性分别为80%～100%和95%～100%，具体数值根据方法选择不同略有差异(表88-3)。

使用包含HMPV在内的(呼吸系统)症候群组合测试有几个优点：首先，由于HMPV感染的临床表现并不特异，使用组合测试可同时覆盖多个呼吸道病原体，某些情况下同时包括细菌和病毒。其次，组合测试还可以检出多种病原体共感染。在一项法国的儿童队列研究中，42.9%的HMPV阳性的样本同时能检出另一种病毒[136]；

在另一项加拿大的研究中，15%的 HMPV 阳性样本混合其他病毒共感染，检出混合感染比率最高的是 6 个月以下儿童标本，老年人的比例较低[137]。但是，应当谨慎解读"合并感染"的检测报告。首先，频繁进行核酸扩增的实验室因交叉污染，导致了 PCR 检测容易产生假阳性结果；其次，RT-PCR 可以检出呼吸道分泌物中的病毒基因组，持续数周甚至或更长时间，甚至是已停止排出有活性病毒时也可检测到。在这种情况下，存在病毒特异性核酸检测的阳性结果，很难区分患者是活动性感染还是最近发生过急性感染。尽管现在没有常规用于临床中 HMPV 感染诊断，定量分子生物学检测技术在未来将有更好的应用前景，它可以区分急性和恢复期感染，并明确阳性结果的临床意义[138-141]。

(七)分离程序

HMPV 最早于 2001 年在荷兰被研究者用第三代猴肾脏细胞中分离出来[89]。HMPV 在传统的用于培养呼吸道病毒的细胞系内复制能力较弱，或者根本不能复制，例如，HEK、HEp-2、Madin-Darby 犬肾（Madin-Darby canine Kidney，MDCK)细胞。加入了低浓度的胰蛋白酶可以促进病毒原代分离，但这并不应用于常规病毒培养的诊断实验室。一项研究表明，恒河猴肾上皮细胞(LLC-MK2 和 Vero)及人呼吸道上皮细胞细胞系（BEAS-2B）最适合 HMPV 培养。LLC-MK2 细胞可以耐受胰蛋白酶，因而可作为 HMPV 培养最理想的细胞系[130]。在另一项研究中，人喉癌细胞系(HEp-2)比 LLC-MK2 细胞对 HMPV 分离培养更加敏感：在所有 HMPV 分子检测阳性的样本中，使用 HEp-2 细胞接种可以获得 88%的培养阳性率，而 LLC-MK2 细胞接种阳性率仅有 24%[131]。离心培养能显著增加 HMPV 对单层培养细胞的感染性[130,142]。HMPV 在 LLC-MK2 或 Vero 单层培养细胞中生长缓慢，需要 10～22 天，并且在 CPE 出现之前需要几次盲传，特别是原代分离后。CPE 在病毒培养的过程中常常并不明显，经常仅以局部细胞变圆和细胞融合为"小片状"形式出现[89,131,143]。壳瓶培养法使用 R-Mix 细胞系(Diagnostic HybridsInc. /Quidel Corp，Athens，OH)，以人腺癌细胞(A549 细胞)和水貂肺细胞(Mv1Lu 细胞)混合成单细胞层；此外，一项研究显示，与常规试管培养法相比，采用 R-Mix 细胞培养并联合 HMPV 特异性单克隆抗体检测可将病毒检出率的敏感性提高至 100%[144](图 88-3c)。

(八)鉴定

由于特征性 CPE 的出现并不明显，所以以此为基础来诊断病毒感染并不可取，即便是对于有经验的技术人员，也是如此[89,143]。当在特定的流行季节，从 HEp-2、Vero 或 LLC-MK2 细胞中分离出来的病毒株，在排除其他可能病毒感染后，需要怀疑 HMPV 分离株可能性。特异性的病毒鉴定必须采用商业化的单抗进行免疫荧光分析或采用裂解细胞物的 RNA 提取物进行 RT-PCR 检测。

(九)分型系统

以融合(F)基因和糖蛋白 G 基因作为靶标的核酸序列分析可以区分 HMPV-A 和 HMPV-B 2 种基因型，根据核衣壳基因的分析进一步序列分为 A1、A2a、A2b、B1 和 B2 5 种亚型[96,145-146]。HMPV 的 G 糖化蛋白基因展现出极大多态性，G 蛋白的核苷酸和氨基酸序列在 A 型和 B 型 2 种基因型病毒株的组内相似性范围分别为 52%～58%和 31%～35%[90,147]。逆转录核酸扩增和双向扩增片段测序是 HMPV 基因分型的一种常用方法，可以直接针对临床样本[96]或者病毒培养分离株[145-146]进行测序。有学者研究了 HMPV 基因型和疾病严重程度的关系，但研究之间的结论差异较大，有些认为分型对疾病严重程度没有影响，有些认为 A 型引起的疾病更严重，而有些认为 B 型引起的疾病更严重[148-151]。因此，目前 HMPV 病毒株的分型主要用于流行病学研究。诸如全基因组测序等新的方法正在研究当中，将来可能为 HMPV 物种系统发育提供更多的信息。

(十)血清学试验

血清学检查一般不用于 HMPV 感染的临床诊断。因为，使用血清学诊断需要采集间隔 4～8 周以上急性期和恢复期双份血清的抗体滴度，观察到 4 倍以上的抗体滴度升高具有诊断意义[152]。目前已有一些使用病毒感染细胞的裂解物和重组病毒蛋白进行酶联免疫吸附测定的血清学试验方

法[89,153-133]。这些检测绝大多数使用病毒噬斑减少或出现CPE作为检测标志；目前已有一个更客观的微量中和试验方法被报道，利用一种表达绿色荧光蛋白的重组HMPV进行病毒检测[156]。

(十一)结果的评价、解释和报告

自2001年被发现以来，HMPV感染的快速诊断技术得到了极大发展。目前已经有多种商品化的试剂盒面市用于鼻咽拭子标本的检测。其他的标本类型，包括下呼吸道标本如支气管肺泡灌洗液，也已经被一些实验室验证可以用于这些检测方法。多重PCR方法为实验室提供一定时间范围内的快速诊断能力，从而更好地管理呼吸道感染患者。

HMPV阳性的实验室结果必须结合正确临床背景进行解读。一般来说，在冬末或春初、温带地区的急性呼吸道疾病患者的呼吸道样本进行检测时，当患者HMPV检测特别是核酸检测呈现阳性，提示这例患者极有可能感染了HMPV。NAAT不能作为HMPV感染是否治愈的指标，因为在感染过程中，患者的排毒持续时间还未明确。此外，由于共感染的疾病意义尚未明确，HMPV核酸检测的阳性结果的解释具有挑战性，特别是当样本中还有其他病毒核酸被同时检出时。基于实时荧光定量PCR的定量分子检测结果，包括循环阈值在内，不但有助于确认阳性检测结果的临床意义，而且能够区分急性和恢复期感染。循环阈值与临床标本中的HMPV的载量呈现负相关，当出现高循环阈值时，更支持诊断为恢复期感染。然而，HMPV定量PCR的价值仍有待研究证实。目前，血清学试验和病毒分型主要应用于流行病学研究。

参考文献请扫二维码查阅

第89章 麻疹和风疹病毒

CAROLE J. HICKMAN, JOSEPH P. ICENOGLE

(徐春晖 译;韩晓旭、汤一苇 审校)

一、麻疹病毒

(一)分类

麻疹病毒(measles)是副黏病毒科麻疹病毒属的原型成员,也是该属中唯一致人疾病的成员[1]。麻疹病毒属的病毒成员都具有严格的宿主寄生范围,这表明病毒与相应的动物宿主存在长期的接触与适应关系。本属的其他病毒成员还有牛瘟病毒(rinderpest virus)、犬瘟热病毒(canine and phocine distemper viruses)、小反刍兽疫病毒(peste des petits ruminants virus)和鲸麻疹病毒(cetacean morbillivirus)。

(二)病原体介绍

麻疹病毒是一种多形性、有包膜、非节段的单股负链RNA病毒,病毒颗粒(virion)大小为50~510 nm。麻疹病毒基因组RNA有15 894个核苷酸,偶见基因组长度变异报道[2]。线性基因组包含6个基因,其在单链RNA中的排列顺序与大部分副粘病毒科中成员相同,为3′-N,P,M,F,H,L-5′。除磷蛋白基因P(phosphoprotein)外,每个基因均编码一个蛋白产物。P基因编码两个非结构蛋白(V和C)和一个结构蛋白,核蛋白N(nucleoprotein)最早产生且是含量最高的蛋白,N蛋白包裹全长负链(基因组)和全长正链(互补基因组)RNA。

P基因和聚合酶基因 *L*(polymerase)的编码产物能与全长病毒RNA结合形成核糖核蛋白复合物;来自于细胞质膜的包膜包裹病毒核衣壳,包膜上有基质蛋白(matrix)、融合蛋白(fusion)和血凝素蛋白(hemagglutinin),分别由病毒的 *M*、*F* 和 *H* 基因所编码。F和H包膜蛋白是N端连接的跨膜糖蛋白,并形成多聚体复合物介导病毒进入宿主细胞[1]。糖蛋白H是中和抗体的主要靶标,进入宿主细胞是由糖蛋白H与3种宿主细胞受体其中之一结合开始,3种受体分别为:CD46[3]、CD150[人信号淋巴细胞活化标志物蛋白(human signaling lymphocyte activation marker,hSLAM)[4]]及上皮细胞蛋白结合素-4(nection-4)[5],免疫系统很多细胞表达CD150,包括淋巴细胞、树突状细胞(dendritic cells)和一些巨噬细胞[4],人类有核细胞均表达CD46,呼吸道上皮细胞的黏着连接(adherens junctions)表达细胞蛋白结合素-4[6]。

尽管麻疹病毒只有一个单一血清型,但在野生型病毒和疫苗株病毒中均已检测到抗原和基因变异性。到目前为止,人群接种疫苗病毒株产生的免疫力可以抵御流行病毒株导致的麻疹疾病。麻疹病毒作为一种RNA病毒,由于缺乏RNA依赖聚合酶的校对能力,因此在复制过程中会产生变异。这种变异可在麻疹暴发期收集病毒分析中发现,对分子流行病学解释核苷酸差异有意义。野生型病毒的核苷酸序列变异性在编码N和H蛋白的基因中最显著,达到7%~10%,且 *N* 基因编码区的最后450个核苷酸是变异性最大的序列,达12%左右[7]。麻疹病毒的命名标准正是基于N基因序列。基于该序列区域,已经建立标准命名法。病毒基因型别是分子流行病学研究的操作分类单位,是以不同进化枝(clade)作为型别分类依据。目前,世界卫生组织将麻疹病毒分为A~H 8个不同进化枝,在这些进化枝中,已鉴定出24个基因型(genotypes)[8],在2010—2015年检测出7种不同基因型[9]。最近几篇综述[10-12]概述了全球麻疹流行病学及基因型分布。

(三)流行病学和传播

麻疹病毒是一种通过吸入气溶胶(aerosols)或呼吸道飞沫传播的经空气传播的病原体,也可以通过直接接触感染的分泌物或污染物传播。动物研究表明,当以CD150为介导进入靶细胞时,感染的是肺泡巨噬细胞和树突状细胞[13-14]。麻疹病毒也可扩散到皮肤和结膜中,在内皮细胞、巨噬细胞和上皮细胞中复制[15],导致病毒转移到局部淋巴结,感染的免疫细胞随后促进病毒在淋巴器官和非淋巴器官的转移。麻疹是高度传染性疾病,在暴露情况下,高达90%易感个体可感染此病[16]。在疫苗尚未问世前,超过90%的人会在10岁前感染麻疹病毒。麻疹病毒的再生指数(reproduction number,R_0)估测为9~18,高于其他病毒性疾病如天花(smallpox)和脊髓灰质炎(polio)。基于对传染力(transmissibility)的衡量,阻断麻疹传播所需的群体免疫阈值(herd immunity threshold)估测为89%~94%[17]。

在未接种疫苗的人群,麻疹呈周期性流行,间隔期为2~5年。随着未接种疫苗人群的人口数量和密度的增高,麻疹流行的间隔期相应缩短,且间隔期与对麻疹造成持续传播的易感个体的数量直接相关。在已接种疫苗的人群,麻疹暴发的间隔期延长,足够高的疫苗接种水平可阻断地方性传播。随着疫苗的接种,麻疹感染患者的年龄分布是由缺乏疫苗或麻疹病毒诱导的免疫能力所决定的。在美国,两剂麻疹疫苗的高覆盖度已经成功阻断了地方性传播,并于2000年宣布消除了麻疹[18]。2014年召集的专家组证实了西半球麻疹、风疹(rubella)和先天性风疹综合征(congenital rubella syndrome,CRS)的消除得到维持[19]。麻疹病毒流行株的消失和由此造成的人免疫反应天然“强化”的缺失,自然感染或疫苗接种提供的保护时间尚不清楚。虽然最近美国麻疹病例大部分发生在未接受疫苗人群,但仍有少量来自已经接种疫苗或假定免疫人群的病例[20-25]。已经在几十年前接种过两剂麻疹疫苗的成人病例令人担忧,这表明疫苗诱导的中和抗体滴度随着时间推移而下降是可能的,对麻疹疫苗的免疫记忆比以前认为的时间要短。已经接种过疫苗的麻疹患者,其实验室确认具有挑战性,因为IgM检测可能会给出不确定的结果,尽管在适当时间进行逆转录-聚合酶链反应(reverse-transcription PCR,RT-PCR)检测可以确认,但阴性结果不能排除高度疑似的病例。在这些患者中,症状从典型到轻微不等,发热和皮疹的程度及持续时间都较缓和。事实上,实验室检测结果表明这些患者在出疹的最初几天内,其免疫系统的记忆应答反应得到强化,表现为IgG的高亲和力和不常见的高中和抗体反应(>40 000 mU)[21-23]。在没有确诊的麻疹暴发情况下,症状温和的疑似麻疹病例可能无法识别。虽然一些研究显示这些患者仅存在低传播风险[22,24,26-27],但同时也存在其他研究指出该类患者具有传播能力[23,25,28],公共卫生实践中仍需要对这些感染者进行监测,以确保他们携带的麻疹病毒不会通过接触传播,特别是不会传播给未接种疫苗的人群。

尽管麻疹在全球许多国家和地区仍然是威胁儿童健康的重大疾病,但在全球麻疹控制和降低死亡率方面已经取得了巨大进展[12]。减毒株麻疹疫苗的高效使用联合多次接种策略(二次接种机会)使麻疹在广大地区被消灭,包括美国、澳大利亚、北欧国家及英国[29-30]。2000年,全球麻疹发病率为146例/百万,降低至目前麻疹发病率的36例/百万[31-32]。虽然发病率因不同的世界卫生组织国家和地域而异,但截至2015年,已经有109个国家的发病率<5例/百万[31-32]。近期,在财政和后勤困难、安全问题及对接种疫苗的反对意见的多种因素影响下,麻疹病例在一些已经建立疫苗接种策略的地区再次出现[33-35]。为实现成功消灭麻疹这个目标,需要各国给予持续有力的政府支持,特别是财政支持。世界卫生组织建议当实现消灭区域性麻疹的目标后,要持续下去以实现全球范围内消灭麻疹的终极目标[36]。在2012年,麻疹和风疹行动(Measles and Rubella Initiative)发起了一项新的全球麻疹和风疹战略计划(2012—2020),国家接种免疫管理人员也对在2015和2020年分别达到控制和消灭麻疹的目标提供了明确的战略计划[37]。

(四)临床意义

1. 无并发症的临床表现 暴露感染后的7~10天内,临床表现为咳嗽、鼻炎、结膜炎和发热。接下来的3~4天为前驱期,临床症状会加重,体温可高达40.5 ℃。出疹前2~3天,50%~90%

患者的颊部黏膜会出现科普利克斑（Koplik's spots），这是麻疹的特异性标志，并且在出疹后持续 1～2 天。科普利克斑是小的不规则红斑，斑中心有蓝白色小点。在暴露感染后 2 周左右，患者皮肤表面会出现红疹，首先是在额头或耳后出现。直径 1～2 mm 的红疹在接下来 3 天会变成斑丘疹。在脸和身体上部皮肤表面出现的红疹通常呈融合状，压之褪色。出疹后第 2 天，躯干和上肢会出现皮疹，第 3 天下肢也会出现皮疹。皮疹消退顺序与出疹相同，首先是脸和颈部皮疹消失。皮疹消退后会留下棕色色素斑，持续 7～10 天，随后会出现脱屑症状。大多数患者能迅速痊愈。

麻疹患者中因呼吸和神经系统原因致死比例为 1/1000，婴儿及成人因患麻疹而死亡的危险率比儿童及青少年高。然而，发展中国家的婴幼儿，特别是营养不良人群急性麻疹病毒感染的死亡率非常高，接近 10%，同时其发病率也更高。

2. 并发症 麻疹病毒感染导致的系统性免疫抑制是由于记忆 T 细胞和 B 细胞的耗竭[38]。这种免疫抑制可持续数周至数月从而导致患者容易发生继发感染，尤其是在发展中国家的儿童和免疫功能不全人群中[39]。麻疹病毒感染最常见的并发症是中耳炎（7%～9%）、肺炎（1%～6%）和腹泻（6%）。明显的中枢神经系统并发症包括急性播散性脑脊髓炎（acute disseminated encephalomyelitis）和亚急性硬化性全脑炎（subacute sclerosing panencephalitis，SSPE）。1/1000 的麻疹患者会在出疹后 1 周左右出现急性播散性脑脊髓炎，其临床症状表现为癫痫、嗜睡、兴奋和（或）昏迷。在美国宣布消灭麻疹后的时间里，大约每 1000 个麻疹病例中，有 1～3 人因呼吸系统及神经系统并发症死亡。

SSPE 是渐进性、致死性、晚期神经性并发症，是由 CNS 中持续性麻疹病毒感染所致，麻疹患者中发病率为 1～4/万[15,40-41]，其中在小于 5 岁儿童中发病率更高。近期一项研究显示在 1988－1991 年期间，SSPE 发病率更高，小于 5 岁麻疹儿童的 SSPE 发病率为 1∶1367，小于 12 月龄麻疹患儿的 SSPE 发病率为 1∶609。仅发现野生型麻疹病毒核酸序列与此病有关，麻疹疫苗的使用在很大程度上消除了美国的 SSPE[41,43]。从野生型病毒感染到出现 SSPE 平均潜伏期为 7 年，导致 SSPE 初期容易误诊。其典型临床表现为性格改变、运动能力降低、智力衰退、不自主运动和肌肉强直，最终导致死亡。从脑组织标本中很难分离到病毒株，需要运用共培养或脑组织移植技术才能实现，但病毒蛋白和 RNA 很容易从脑组织标本中检出[44-45]。在 SSPE 患者的血清和脑脊液标本中通常能查到高滴度的麻疹病毒特异性 IgG 抗体。

孕妇感染麻疹会增加流产、胎儿及新生儿并发症及早产的风险，但是否会导致胎儿先天性畸形还缺乏确凿证据。

非典型麻疹综合征（atypical measles syndrome）仅见于在多次接种福尔马林灭活的麻疹疫苗后暴露于野生型麻疹病毒的人群中。1963－1967 年，估计有 60 万～90 万人在美国接种了福尔马林灭活的疫苗。该综合征目前认为是阿蒂斯反应（Arthus reaction）联合迟发型超敏反应的免疫病理反应所致[46]。麻疹活疫苗复种可预防非典型麻疹。

尽管一些公众对麻疹-腮腺炎-风疹（measles-mumps-rubella，MMR）疫苗与自闭症之间可能存在联系表示担忧，美国医学研究所（Institute of Medicine）及美国儿科学会（American Academy of Pediatrics）这 2 个独立的非政府组织对证据进行了审查并独立得出结论，尚无确凿的证据表明 MMR 疫苗接种会导致自闭症谱系障碍（autism spectrum disorder）[47-48]。

免疫功能低下的麻疹患者会出现如巨细胞肺炎（giant-cell pneumonia）和麻疹包涵体脑炎（measles inclusion-body encephalitis，MIBE）等综合征[49-50]。由于无皮疹形成，容易忽视麻疹诱导的巨细胞肺炎。巨细胞肺炎大部分发生在 T 细胞免疫功能缺陷患者中，如白血病、淋巴瘤及 HIV 感染，也会发生于患有严重免疫缺陷综合征的儿童接种疫苗后[51]。MIBE 通常发生在感染或接种疫苗 1 年内，一般是致死性的。有多个关于 HIV 患者感染麻疹后发展成重症甚至死亡的病例报道[52-53]，近期有研究显示 HIV 感染者可能有着更高的 SSPE 风险[54]。

（五）标本的采集、运输和储存

鼻咽（nasopharyngeal，NP）或口咽（oropharyngeal）拭子是采用逆转录-PCR 方法检测麻疹病毒 RNA 或病毒分离的首选标本。采集标本后，将

拭子置于1～3 ml的病毒转运培养基，避免干燥。麻疹病毒对热敏感，当标本未保持冷藏（4～8℃），传染力（infectivity）可显著下降。如果条件允许，用于RNA检测的临床标本或分离的病毒应置于－70℃保持病毒活性（viral viability）。如不能置于－70℃，标本也可置于－20℃保存，该温度下病毒活性可能丢失，但仍可维持病毒RNA的完整性，并可通过逆转录-PCR检测。如果不具备－70℃或－20℃冰柜，建议冷藏（4℃）保存样本。样本在采集后应该即刻运送，避免反复冻融。在皮疹出现后应尽快进行用于分子生物学检测和病毒分离标本的采集，因此时病毒的载量最高。尿中也可能存在病毒，同时采集尿和NP标本可提高检出率。由于麻疹病毒是与细胞密切相关的，因此，如果可能，采集的尿（10～50 ml）需要在500×*g* 中离心10 min，且在4℃条件下最佳[55]。沉淀可在2～3 ml无菌运输培养基、组织培养液、或生理盐水中重新悬浮。如条件允许，重新悬浮的尿沉渣应在－20～－70℃条件下冷冻保存和运输。如果不具备上述处理尿标本的条件，将未离心的尿标本在4℃保存，并尽快用防漏容器装在冷藏箱中转运。也可使用鼻腔抽吸物或支气管肺泡灌洗液进行核酸的检测，在特定条件下全血、血清、脑组织、皮肤活检标本也可使用。麻疹病毒亲淋巴细胞，巨噬细胞是麻疹病毒天然感染过程中一种已知的感染靶细胞[56]，因此外周血单个核细胞（peripheral blood mononuclear cells，PBMCs）是用于做麻疹病毒分离的理想标本。PBMCs从含肝素抗凝（1∶3比例稀释）的血标本中经密度梯度沉降而得到。

对疑似麻疹病例应尽早采集血标本（通常使用红帽或血清分离管采集5 ml）。离心分离血凝块中的血清，通过无菌操作将血清转移至无菌管内。血清标本置于4℃保存，并用冰袋运输。在大多数情况下，单一血清标本足够检测[57]。然而在大约30%的麻疹病例中，在皮疹出现后的前72 h内血清中未检测到麻疹特异性IgM[58]。为评估接种疫苗后血清抗体转换情况，可使用配对血清样本通过IgG酶免疫试验（enzyme immunoassays，EIAs）或空斑减少中和（plaque reduction neutralization，PRN）试验进行检测。收集2份样本，一份在疫苗接种前，一份在疫苗接种后3～4周，这样可检测到麻疹病毒特异性IgG升高。血清标本理想的保存环境是－20℃，但抗体在4℃环境可长时间保持稳定。做IgM检测的血清不能反复冻融5次以上。此外，具有或可能具有神经系统并发症的患者应采集脊髓液标本。用于做免疫荧光试验（immunofluorescence assays，IFAs）的呼吸道标本应在玻片上用低温丙酮固定2 min，然后保存于4 ℃的环境中。

用于麻疹诊断采集血清标本的替代选择包括使用龈沟液（gingival crevicular）或口腔液（oral fluid，OF）及滤纸血点（blood spots on filter paper）。OF标本可用于检测麻疹病毒特异性IgM和IgG，也可用于肝炎、风疹、腮腺炎和其他感染性疾病的检测[59-61]。这种标本采集方法在英国仅用于常规麻疹、风疹和腮腺炎筛查[62]，此方法比较受欢迎的原因是其采集过程无创，也不需要医疗专业背景。标本也可用于风疹病毒检测，但缺乏足够敏感的风疹IgM检测方法限制了其在风疹感染方面的应用。OF标本在现场无须处理即可用于麻疹病毒特异性IgM的确证检测及病毒核酸的分子鉴定[63-64]。OF检测的总成本与传统血清检测相似，但因OF标本一般情况下不需要冷链，运输成本往往较低。用商品化的血清检测试剂盒检测OF标本会产生高背景和低敏感性问题，同时气温升高时OF标本冷链运输也是个问题。一些标本保存管（如OraSure）含有能稳定IgM的添加成分，但此添加成分会抑制核酸扩增，如果需要进行分子检测，则应避免使用这类标本保存管。

和OF标本一样，保存在滤纸上的血点在现场无需处理，冷链也非必需。此类标本可用于检测风疹和麻疹，也可用来进行麻疹病毒基因组的分子特征研究[65-68]。此外，从血点上洗脱下来的血清可用商品化的麻疹ELISAs试剂盒进行检测，敏感性和特异性不会降低[65,69-70]，这项技术普及使用的前景很大。虽然这项技术仍然是有创性的，但手指刺进采血即可，比静脉采血更容易让患儿父母接受[71]。

2008年世界卫生组织发表了关于使用干血斑（dried blood spots，DBS）和OF作为麻疹和风疹诊断样本的评估和建议，支持这2个方法在全球范围，特别是患者对静脉穿刺采血抵触的地区或标本保存和运输条件无法满足的地区用来作为麻疹和风疹监测的可选方法[63]。近期的相关综述对麻疹和风疹血清流行率研究中采用的检测形式和

标本类型进行了分析[72-73]。

(六)直接检测

1. 细胞学检测 麻疹病毒感染导致的特征性细胞病变效应(cytopathic effects,CPE)包括多核细胞及细胞内出现包涵体(inclusions)(胞质内和核内)。玻片可以用瑞氏染液(Wright stain)或苏木素(hematoxylin)和伊红(eosin)进行染色,常可见含多个重叠核的巨细胞,即Warthin-Finkeldey巨细胞(Warthin-Finkeldey giant cells)。组织标本在10%甲醛溶液中浸泡固定后再用石蜡包埋并制成切片,切片用苏木素和伊红染色。用抗麻疹病毒N蛋白的单克隆抗体对组织标本进行染色可用于诊断巨细胞肺炎和MIBE[74]。通常使用免疫荧光、免疫组化或逆转录-PCR方法对麻疹病毒进行分离验证。

2. 免疫荧光检测 临床标本和接种了临床标本的细胞培养物可用免疫荧光抗体(immunofluorescent antibody,IFA)检测其中是否有麻疹病毒。标准方法是用商品化的抗麻疹病毒N蛋白单克隆抗体和荧光标记的羊抗鼠抗血清(见下"麻疹病毒分离的确证")。鼻咽抽吸物或后鼻咽部拭子是可选标本,标本用无菌盐水稀释后离心沉淀细胞。沉淀细胞再用无菌盐水溶液洗涤多次,接着将细胞铺在载玻片上,用80%冷丙酮在-20℃下固定10 min[75-76]。用抗麻疹病毒N蛋白的单克隆抗体和相应的带荧光标签的二抗结合后,在多核巨细胞的细胞质中可见颗粒或斑点状荧光。

3. 核酸检测技术 标准的逆转录-PCR和逆转录实时荧光定量PCR(real-time reverse-transcriptase quantitative PCR,rRT-qPCR)可用于多种临床标本和感染细胞关于麻疹病毒感染的实验室确认[77-78]。虽然同时收集血清及分子生物学检测标本是推荐的最佳麻疹确诊途径,但分子检测方法在某些方面具备更多优势。例如,当IgM检测受到当前或近期接种的麻疹疫苗干扰时(如作为应对暴发流行或强化接种)时,逆转录-PCR对于麻疹病例的确认更具优势[79]。同时,当需要通过检测病毒基因特征以确认暴发病例是否关联及绘制传播模式图情况下,推荐使用分子生物学检测方法。病毒RNA检测也适用于麻疹低发病率和消除后环境下的麻疹病例分类,因其假阳性率低于IgM检测。逆转录-PCR扩增和N蛋白编码基因最后450个核苷酸的测序用于麻疹病毒基因分型。基因分型是唯一能区分疫苗反应与野生型麻疹病毒感染的诊断方法,近期一种快速鉴定方法的研究已经得到发表[80]。近年来,使用逆转录-PCR确认病例越来越多,如果在皮疹出现后早期采集标本,该方法敏感性和特异性均高于血清学试验。

(七)麻疹病毒的分离和鉴定

麻疹病毒可以在前驱期的晚期和出疹期的早期从结膜、鼻咽和血标本中分离到。虽然晚至出疹后4~7天病毒仍可从尿中分离到,但病毒血症一般在出疹后2~3天即消失,与抗体出现的时间一致,易于分离病毒的时间范围为出疹前2~4天至出疹后4天。细胞培养物和细胞系如B95a、原代猴肾细胞和Vero细胞可用于麻疹病毒分离。然而,为了提高实验室的安全性和效率,Vero/hSLAM细胞系目前广泛应用于麻疹病毒的分离,并在属于世界卫生组织全球麻疹和风疹实验室网络(Laboratory Network,LabNet)的大部分实验室采用。这种细胞是通过将携带hSLAM基因的质粒转染Vero细胞系构建的,适宜麻疹和风疹病毒生长[81]。hSLAM分子是野生型和实验室适应型麻疹病毒株的细胞表面受体。实验结果显示,Vero/hSLAM细胞系分离麻疹病毒的敏感性与B95a细胞系相当。Vero/hSLAM细胞系也可表达猿猴CD46分子。

麻疹病毒分离的确认 麻疹病毒培养分离后的鉴定常用IFA方法,此方法主要是用单克隆抗体检测麻疹病毒N蛋白或感染细胞中病毒其他内部抗原蛋白。感染的细胞固定在载玻片上后,用耦联荧光素的羊抗鼠二抗检测麻疹病毒特异性抗体与病毒抗原的结合。IFA检测试剂盒可从多种商业途径购买。也可不通过商业试剂盒在实验室构建间接IFA检测。大多数抗N蛋白的单克隆抗体在IFA过程中实验效果良好。其他病毒蛋白(如血凝素和融合蛋白)的单克隆抗体识别的构象表位在丙酮固定后会变得不稳定。实验室自建IFA方法时,需要用滴定法确定单克隆抗体和荧光素标记二抗合适的工作浓度。

(八)基因分型

针对麻疹病毒N蛋白基因最后450个核苷酸

的扩增测序及系统进化分析(基因分型)可用于麻疹暴发时对流行病毒株进行溯源、追踪传播途径,以及区分疫苗株和野生株[32,82-83]。分子检测是由疾病预防控制中心(Centers for Disease Control and Prevention,CDC)和一些州立公卫实验室进行,在 2013 年,建立了 4 个疾病预防疫苗参比中心(Vaccine Preventable Disease Reference Centers,VPD RCs)目的在于以共享服务的模式提供增强的 VPD 检测能力。通过竞争方式确立了 4 个公卫实验室(加利福尼亚公共卫生部、明尼苏达州卫生部、纽约州卫生部暨华兹华斯中心和威斯康辛州卫生实验室),采用 CDC 的分析方法,对 4 种病毒及 3 种细菌性疾病进行检测,其中包括麻疹和风疹。参比中心的使用有所增加,截至 2016 年底,已经注册 51 个州(县)医疗实验室,大部分麻疹分子生物学检测已经从 CDC 转移到 RCs。目前,RCs 通过 HL7 2.5.1 将检测结果传递给 CDC,报告结果通过其他方式(电话、传真或加密电子邮件)传递给项目申请实验室,然后由提交实验室将结果传递给管辖的流行病学专家。

野生型麻疹病毒基因特征的鉴定为研究病毒传播途径提供了科学依据,分子流行病学联合常规的病例研究可确定输入病例与国外传染源的联系。基因分型也是建立和维持美国和美洲地区麻疹消除状态的重要指标[19]。基于实验室的包括野生型病毒基因特征鉴定的麻疹和风疹监测网在世界卫生组织实验网络部门(LabNet)的推动下在全球范围得到推广,已覆盖世界卫生组织 193 个成员国中的 191 个国家和地区。这些遗传学数据在确定病毒传播来源、分析未知传播源的病例的可能来源以及为不同病例和暴发疫情建立联系上提供了尤为重要的帮助。病毒学监测还能为某些地区地方性麻疹传播的阻断提供证明。因此,麻疹病毒的分子特征鉴定是衡量麻疹控制方案有效性的有用方法,病毒学监测应当在全球范围内推广普及且应用在麻疹控制的各阶段[19,82,85-86]。需要强调的是常规的流行病学和病例调查分析只有联合分子研究才能取得最佳效果。

(九)血清学试验

麻疹临床诊断的实验室确诊方法中使用最广泛的是血清 IgM 的 ELISA 检测。商品化的 IgM 分析已被全球众多公卫组织、医院、商业实验室所采用。ELISA 是泛美健康组织(Pan American Health Organization)的实验室监测网在全美范围内从麻疹控制至消除整个时期内使用的主要确诊的检测方法。世界卫生组织实验室网络(LabNet)同样也推荐 IgM ELISA 法对麻疹进行实验室确诊[87]。在麻疹被消除的地区,麻疹病例的诊断会更困难,ELISA 结果也不可靠。使用逆转录-PCR 进行确认已经成为美国一种常规辅助手段,由于阳性预测值和疾病患病率均比较低,分子诊断很大程度取代了 IgM 检测。许多参比实验室也通过进行 IgG 检测及一些情况下检测 IgG 活性来进行监测和病例分类[82,88]。ELISAs 仅需采 1 管血清标本即可做 ELISA,实验耗时相对较短(需 2~6 h),操作简单,从出疹开始直到出疹后至少 4 周的时间段内均可对急性麻疹感染进行诊断。ELISA 满足麻疹实验室检测的所有基本要求,即准确、有效和高效。IgM ELISA 涉及间接 ELISA 法和 IgM 捕获法这 2 种方法[89-91]。虽然常被认为 IgM 捕获法的敏感性比间接 ELISA 法要高,但对商业试剂盒的比较研究表明这 2 种方法的敏感性和特异性都相近[92-93]。

传统的抗体检测方法如血凝抑制(hemagglutination inhibition,HI)试验、空斑减少中和试验(PRN)和 ELISA 试验是应用广泛的临床麻疹血清学确诊检测方法。由于商品化 ELISA 试剂的高敏感性和高特异性,ELISA 在传统抗体检测方法中应用最广。商品化 IgM 和 IgG ELISAs 试剂盒既能用于麻疹感染的确诊,还能对麻疹防控情况进行监测。虽然数量有限,但有一部分 IgG 检测试剂盒的敏感性和特异性不亚于空斑减少中和试验[94-96]。一般而言,IgG ELISA 检测或类似方法常用于监控研究(抗体流行率),而空斑减少中和试验在研究与免疫相关问题时应用较多。绝大多数实验室具备开展 ELISA 检测的软硬件条件。

商业实验室和一些大型临床检验中心若要开展大量麻疹(和风疹)标本检测,需要具备高通量全自动联合 ELISA、化学发光和 Luminex 免疫分析的仪器平台[97],虽然这种操作平台与传统的 ELISA 方法有所差异,但操作简单和出报告快的优点使其在疾病大型监测、血清流行病学和血清转换研究方面有很强应用优势[97-98]。

1. 标准 ELISA 方法 ELISA 法检测血清麻疹特异的 IgM 抗体是麻疹快速实验室确诊的标准

方法。尽管微量滴定板组成各异，但大体来说，均是由血清抗体与包被的抗原结合并被酶标抗体捕获而得以检测。ELISAs 方法快速、可靠、相对成本较低可适用于大批量检测[99-100]，利用重组表达的麻疹病毒 N 蛋白进行捕获和间接 ELISA 比其他商品化 ELISA 方法敏感性和特异性都更高[90-91]。间接 ELISAs 经常用于检测麻疹病毒 IgG 抗体以确定免疫状态，同时在必要时也可通过滴度 4 倍增高来确诊麻疹感染。

2. IgG 抗体亲和力分析 IgG 亲和力（IgG avidity）是评价抗原诱导的 IgG 抗体结合强度的一个指标。第一次抗原暴露可使机体产生低亲和力抗体，随着时间延长（数周到数月），通过体细胞高频突变可选择出高亲和力和抗原特异抗体。已经开发了判断麻疹病毒 IgG 抗体亲和力的自建及商品化的 ELISAs 方法[95,101-102]。这种亲和力差异可以在麻疹病毒 IgG 间接 ELISA 法的洗涤步骤中用蛋白变性剂（例如，6～8M 尿素或乙二胺[103]）检出。通过比较在清洗缓冲液时使用变性剂与否的差异计算出亲和力指数。这些检测在区分疫苗和天然感染所导致的初级和次级免疫反应方面有应用价值[24,104]。麻疹亲和试验虽然应用范围有限，但当 IgM 试验结果与临床症状和病史有矛盾产生不确定或疑问时，麻疹亲和力试验是一种很有效的排除方法。

3. 空斑减少中和试验 空斑减少中和试验（plaque reduction neutralization，PRN）可以检测能与麻疹病毒表面糖蛋白直接作用的中和抗体，此方法比血凝抑制试验和 ELISA 试验的敏感性和特异性都要高[105]。由于能够检测功能性抗体，PRN 法可以为评价免疫保护提供可靠的血清学信息[106-107]。但由于耗费劳动力、需要采集双份血清，而且 5～7 天才能出结果，PRN 试验并不适用于常规临床血清学诊断。在分析过程中，待检血清在微孔板中做 2 倍或 4 倍梯度稀释，将指定数量的病毒颗粒添加到每个微孔中进行孵育，以使抗体和病毒发生反应。然后将血清-病毒混合物加入含有融合 Vero 细胞单层的组织培养板中并培养 1h。丢弃混合液，加入羧甲基纤维素防止病毒传播。培养 4 天，平板进行染色并计数空斑。能减少 50%病毒空斑的最高血清稀释度为中和抗体滴度。此外，有研究显示已研制出一种用以评价对麻疹病毒免疫力的检测，该检测的原理是荧光染色下空斑减少微量中和分析，该项检测已用于一项大型观察性研究用以评估免疫状态[108]。与常规 PRN 相比，该类检测可以通过更少的血清样本进行高通量的检测，更适用于人群免疫状态的大规模血清学调查。

如前所述，对于接种疫苗人群麻疹的实验室确认充满挑战，因为 IgM 抗体可能是短暂的，病毒 RNA 量也不足。在高亲和力 IgG 抗体的麻疹确诊病例中可以观察到高浓度的病毒中和抗体（PRN 滴度＞40 000）[21-23]，该血清标志物可以用于疫苗接种人群或有疾病史的临床麻疹病例分类。尽管这样的病例并不常见，但在近几次麻疹暴发中发生并得到确认[20,24-25,33]。在美国 2012—2015 年间，8%～16%的麻疹报告病例为已经接受疫苗免疫的人群。当需要进行额外的方法来确诊麻疹感染来进行病例分类时，可以结合 IgG 亲和力检测及 PRN 检测，这种情况通常发生在 IgM 结果疑似假阴性或假阳性且未进行逆转录-PCR 检测时。

（十）结果的评价、解释和报告

麻疹诊断结果的评价和解释可能会很复杂，尤其在已经消除了麻疹的地区。麻疹病毒感染可以通过麻疹血清学试验结果（如麻疹 IgM 抗体阳性、急性期和恢复期双份血清标本中特异性 IgG 抗体滴度显著增高），以及麻疹病毒的分离、临床标本（如尿、血、咽喉或鼻咽分泌物）逆转录-PCR 鉴定麻疹病毒 RNA 等方法来进行诊断。

当血清标本采集时间在出疹早期，血清学试验会导致出现假阴性结果。例如，敏感性和特异性与某些商业化 ELISA 试剂盒相同的 CDC IgM 捕获方法仅能从 77% 的麻疹阳性患者第 1 天出疹时采集的标本中检测到病毒 IgM[109]。此外，接种过疫苗的疑似麻疹感染患者因其特异性 IgM 含量较低且持续时间短容易造成假阴性结果。IgM 检测特异性并非 100%，可以出现假阳性，尤其是在已经消除麻疹本土传播的地区。与引起发热伴皮疹的其他药物发生交叉反应、感染细小病毒 B19、肠道病毒或人类疱疹病毒 6 的情况下检测麻疹 IgM ELISAs 时，可产生假阳性结果（总体比例约为 4%），反之亦然。由于类风湿因子（rheumatoid factor，RF）的存在，也可导致检测假阳性。间接 ELISAs 比 IgM 捕获法更容易受到 RF 的影

响。由于一些病毒感染和自身免疫疾病产生的RF是IgM家族免疫球蛋白，能与IgG相互作用。RF IgM能与抗原特异性IgG结合形成免疫复合物，由于IgG能与病毒抗原结合，这种免疫复合物中IgM类的RF会被指示系统识别从而产生假阳性结果。相似的假阳性结果在抗体捕获法中也会遇到，当标本中抗原特异性抗体和RF含量较高时对结果的影响就更大[89]。最后，伴有咽喉及耳部感染的患者在服用抗菌药物后偶尔会出现皮疹，其血清标本也可能导致麻疹IgM检测假阳性。

当疾病处于低流行状态，ELISAs的阳性预测值是判读结果时需要考虑的因素。在消除了地方性麻疹流行但仍对出疹性疾病进行预警性监测的国家就需要考虑这些因素。由于疫苗诱导的IgG抗体阳性率在这些国家较高，故对麻疹疑似患者的血清标本要同时进行麻疹IgM和IgG ELISA检测，在这种情况下，如果IgG检测阳性而IgM检测阴性，常不考虑麻疹感染（依血标本采集时间而定）。极少数情况下，接种疫苗人群可感染麻疹，其中部分患者可存在IgM反应[21-22]。有证据显示由于自然感染或疫苗接种产生IgG免疫反应的个体再暴露于流行的麻疹病毒时会产生次级IgG和（或）IgM免疫反应[112-113]。此时除极少数情况外，IgM一般是短暂的弱阳性，不会干扰诊断[79]。

表89-1是对ELISA可能出现结果的解释。应该强调的是，需要强调的是绝大多数血清标本的血清学试验结果是容易解释的。虽然血标本检测结果容易解读，但目前CDC的《疫苗可预防性疾病的监测手册（*Manual for the Surveillance of Vaccine Preventable Diseases*）》[114]强烈建议疑似麻疹患者初次到医疗机构就诊时要同时采集血标本和呼吸道标本。此外，应尽可能多地提供临床和流行病学信息给检验人员，以保证正确解释检测结果。

表89-1 麻疹病毒ELISA检测结果解释

ELISA结果		感染史	现行感染	解释说明
IgM	IgG			
+	+或-	以前未接种过疫苗，无麻疹病毒感染史	近期第一次接种含麻疹病毒的疫苗	疫苗接种后，血清抗体转换[a]；IgG如果存在，为低亲和力IgG
+	+或-	未接种过疫苗，无麻疹病毒感染史	野生型麻疹病毒	典型麻疹的血清抗体转换[b]；IgG如果存在，为低亲和力IgG
+	+或-	以前接种过疫苗，初次疫苗免疫失败	近期第二次接种含麻疹病毒的疫苗	疫苗接种后，血清抗体转换[a]，IgG如果存在，为低亲和力IgG，证实初次免疫失败
-	+	以前接种过疫苗且IgG阳性	近期第二次接种含麻疹病毒的疫苗	IgG含量可能维持不变或升高，高亲和力IgG
+或-	+	以前接种过疫苗且IgG阳性	野生型麻疹病毒	症状从典型到轻度皮疹及少量症状[b]；高亲和力IgG，很多PRN滴度>40 000[b]
+	+	近期接种过疫苗	暴露于野生型麻疹病毒	不能区分是疫苗还是野生型麻疹病毒感染；要根据流行病学背景进行评价[c]
+或-	+	很久以前感染过麻疹疫苗	野生型麻疹病毒	可能会有少量症状或无症状[c]；如果与临床表现相符，则可能起初被误诊了

注：[a]IgG水平与标本采集时期相关。[b]这种情况很少见。[c]IgM如果是阴性，有助于排除野生型麻疹病毒感染

实时荧光定量逆转录-PCR（quantitative real-time PCR，rRT-PCR）和常规终点逆转录-PCR均可用于检测临床标本的麻疹病毒RNA，对感染进行实验室确认。麻疹的rRT-PCR检测通常比终点逆转录-PCR检测更敏感。总体来说，终点分析检测是用以扩增确定基因分型所要求的麻疹病毒片段。在已经消除麻疹的情况下，开发与使用分子检测的重要性日益显著，因逆转录-PCR极少发生假阳性。逆转录-PCR实验的成功检测取决于标本采集时间、临床标本质量，所以结果阴性也不

能排除麻疹病毒感染。既往免疫接种人群体内病毒量较少，因此仅在较短时间内产生少量病毒传播。

此外，逆转录荧光定量-PCR（RT-qPCR）方法中扩增的病毒基因组片段不能区分野生型和疫苗株，故接种疫苗的地区暴发麻疹时此方法不适用。强烈建议联合常规逆转录-PCR与核酸测序和基因分型作为实时荧光定量逆转录-PCR（rRT-PCR）的确证检测。基因分型可以区分野生型麻疹病毒感染或近期麻疹疫苗接种带来的皮疹。近期一项快速鉴定方法被开发出来[80]，麻疹病毒分型可以帮助确定美国输入型病例的来源，因为不同国家流行的病毒基因型不同。然而，单一的基因分型检测是不够的，因为每个基因分型可以在多个国家甚至世界不同地域传播。调查人员在确定输入型病例来源时也需要对流行病学信息进行回顾和考虑。

与逆转录-PCR类似，细胞培养的阴性结果解释要谨慎，其中一些主要的影响因素包括标本采集时间、到实验室的转运过程、培养的筹备工作及病毒分离细胞培养体系的选择，其中细胞培养体系往往是最重要的方面。

二、风疹病毒

（一）分类

一类小的有包膜病毒，它们的基因组结构和病毒复制机制相同，归为披膜病毒科（*Togaviridae*）。披膜病毒科由风疹病毒属（*Rubivirus*）和甲病毒属（*Alphavirus*）组成，风疹病毒属仅有一个成员即风疹病毒，甲病毒属含25种病毒，这25种病毒都是通过节肢动物传播[如西方马脑炎病毒（Western equine encephalitis virus）]。风疹病毒具有严格的宿主寄生范围，人是其唯一宿主。

（二）病原体介绍

风疹病毒为球形颗粒，直径70 nm，由核心和包裹在其外面的脂质包膜组成。核心由单股正链RNA基因组（约9760个核苷酸）和病毒蛋白C组成。包膜上含有2种病毒糖蛋白E1和E2[115]。病毒RNA在感染细胞的细胞质中进行复制，5′末端2/3的基因组RNA翻译成非结构蛋白，3′末端1/3的亚基因组RNA翻译成结构蛋白。病毒基因组RNA、E1糖蛋白、E2糖蛋白和C蛋白在细胞膜上装配成完整病毒毒粒[116-117]。

目前在全球流行的风疹病毒株来自于2个有明显差异的进化枝（clades），这2个进化枝的基因组RNA有约10%的差异[118-119]。在进化枝内的不同组又进一步被分为基因型。迄今为止，风疹病毒目前已鉴定有12个确定的基因型（genotypes）和1个暂定的基因型[120]。风疹病毒序列有足够多的基因亚型（subgenotype）聚类（clustering）可以定义谱系，尽管尚未采用正式的命名法[121]。流行病毒株之间仅存在很小的免疫原差异。迄今为止，一个风疹病毒毒株诱发的免疫反应能充分保证机体不再受其他已知的风疹病毒株的侵袭而出现临床症状。

（三）流行病学和传播

受组织培养方法中难以区分受感染细胞形态的影响，风疹病毒直到1962年才被分离出来[122-123]。风疹疫苗在美国研发生产出来后（1969年获得生产批号），通过主要针对儿童进行的免疫接种，很快就将风疹每隔6～9年流行一次的周期打破。美国最后一次风疹流行发生在1964—1965年间，在那期间约2万人患先天性风疹综合征（congenital rubella syndrome，CRS），2100例新生儿发生死亡[124]。风疹较麻疹传染性低，在美国人群疫苗免疫覆盖率达到87.5%，已经消除重大的地方性传播[125]。1972年麻疹-腮腺炎-风疹组合疫苗开始在美国推广使用。风疹和CRS在美国已被消除，2004—2012年仅报道79例风疹患者和6例CRS患者[19,126]。绝大多数CRS患儿的母亲出生在无或刚开始风疹免疫接种项目的国家[127]。在美国偶尔暴发的风疹未传播给完成了疫苗接种的人群，这说明群体免疫可以起到保护作用[128]。本土风疹和CRS不仅在美国被消除，在美洲也被消除。全球麻疹和风疹战略计划（2012－2020年）的目标是，到2015年在世卫组织至少2个区域、2020年至少5个区域消除风疹和CRS[3-4,129-131]。尽管在全球范围消灭风疹的计划具有可行性，但风疹仍在许多国家局部流行且每年约有10万人患CRS[132]。CRS病例中婴儿死亡率可高达30%[133-134]。与感染个体亲密接触是出生后感染风疹病毒的主要传播途径，这种情况常发生在教管所或日托服务机构。

已有大量资料证明广泛使用的活风疹疫苗株(RA 27/3)具有良好的安全性[135]。近期的一项摘要表明怀孕后不小心接种了风疹疫苗的易感母亲所生育的833个婴儿中仅有1例出现与CRS相似的异常症状[136]。但理论上活风疹疫苗株仍存在小的风险。免疫接种咨询委员会建议接种风疹疫苗后28天内应该避孕[16]。

(四)临床意义

第一次对风疹(德国麻疹或3日麻疹)进行描述发生在18世纪,1881年又将风疹认定为不同于麻疹和猩红热的一种新的疾病[137]。出生后感染风疹会急性起病,症状一般为皮肤出现斑丘疹,轻度发热(高于37.2℃),可能伴有关节炎或关节痛(多见于青春期后女性),淋巴结肿大(特别是在耳廓后和枕下淋巴结)和结膜炎。由于风疹病毒造成的疾病较轻,约50%出生后感染风疹患者无法通过临床症状得到诊断。1941年澳洲眼科医生N. McAlister Gregg首次发现母亲在妊娠期感染风疹病毒会导致出生婴儿患白内障[138];先天性风疹感染导致明显的新生儿出生缺陷,包括感觉神经听力丧失、心血管畸形、白内障、先天性青光眼和脑膜脑炎。风疹病毒是目前已鉴定的最强的传染性致畸病原体[139]。

在妊娠后的11周内感染风疹病毒导致婴儿出生缺陷的风险高达90%。妊娠18周之后感染风疹致婴儿出生缺陷的风险会明显降低,但婴儿出生时可能仍然会感染风疹病毒。先天性风疹感染(congenital rubella infection,CRI)是指婴儿出生时感染风疹病毒,无论其有无出生缺陷。值得注意的是,按照CRS定义,患儿需要活产;因此CRS未能充分体现出宫内感染风疹的全部结局,即胎儿死亡不属于CRS。目前关于CRS的发病机制的认知是,在病毒血症过程中,病毒可以在胎盘建立持续性感染,并通过胎盘(在妊娠早期,该屏障尚不能有效防御感染的发生)感染胎儿的分化细胞[140]。由于胎儿不能产生免疫反应且妊娠前3个月IgG经胎盘转运受阻,胎儿的感染常常导致从胚胎到患儿出生后的多器官病毒持续性存在,多种不同类型细胞均会受到影响,包括内皮细胞、神经元细胞、心脏和间质成纤维细胞及肺、肾及眼睫状体的上皮细胞。不同细胞的风疹感染与CRS患者发生的异常一致。患儿的先天性畸形(生长发育迟缓及神经退行性损伤)是由于风疹病毒对感染细胞的直接作用及胎盘损伤和血管功能不全共同引起的。持续性感染可能会导致患者在晚年出现临床症状,如因直接损伤导致的晚发性耳聋及免疫病理机制导致的肺炎。先天性风疹感染会导致婴儿既排出病毒又排出IgM抗体。诊断主要是检测风疹病毒(逆转录-PCR或病毒培养)或检测风疹病毒特异性IgM。如不具备CRS的先天性缺陷表现,则应仅诊断婴儿患先天性风疹感染。虽然CRS的临床定义是标准化的,对疑似CRS病例的确认对于CRS的有效监测至关重要。然而,新生儿风疹病毒感染的实验室确诊才是决定性的,或是通过血清学或是通过病毒检测技术,特别是当新生儿仅有一个出生缺陷时,更应通过实验室检测确诊,因为其他疾病也可出现CRS的缺陷特征[141]。

(五)标本的采集、运输和储存

本章麻疹病毒部分已经包含标本采集相关具体内容,本部分不再重复进行介绍。尽管2种疾病标本采集方式相似,但对于最佳标本采集时间、病毒量存在量和保存等方面,两者存在重要差异。用于风疹病毒培养分离通常采集口咽拭子或鼻咽分泌物标本,用病毒转运培养基保存(如Culturette公司的标本采集和运送装置)。风疹病毒也可从其他标本中分离,如白内障眼部组织和尿(保证pH值在控制范围内)[112]。用于病毒检测的标本可在4 ℃短期保存(数天),长期保存(数周)应置于-70 ℃。病毒颗粒在较高温度下(如37 ℃)会丧失感染性。温热环境(56℃)、去垢剂或脂质溶剂能迅速灭活病毒颗粒(Virions)。可以在尿中检测到风疹病毒特异性IgG[142]。因为病毒在4 ℃是相对稳定的,故可以在4 ℃下用标准方法转运用于血清学试验或培养分离的标本(如通宵运输车)。他标本如干血斑(dried blood spots,DBS)和口腔黏膜渗出液(oral mucosal transudates, OMT)同样适用于风疹病毒监测,DBS和OMT可用于IgM检测,OMT还可用于病毒检测[63-65,143-145]。当用这2种标本做检测时应考虑以下2个限制性因素:一是DBS的检测试剂盒一般未取得FDA认证,二是OMT中低含量的IgM迫使OMT标本需要用高敏感性的检测方法进行检测。

对于出生后风疹感染的检测诊断，标本采集时间非常重要。风疹病毒特异性 IgM 检测是风疹实验室检测的标准，但约 50%风疹患者在出疹当天 IgM 是阴性(表 89-2)。由于出生后风疹感染持续时间较短且较温和，需要在出疹后 5～7 天采集血清标本，此时绝大多数风疹患者处于急症消退之前，IgM 是强阳性。由于先天性风疹综合征患者的 IgM 和病毒会持续数月阳性，故对此类患者的标本采集时间要求不严。

(六)直接检测

1. 核酸检测方法 直接从临床标本中提取风疹病毒 RNA 后做逆转录-PCR 扩增可以诊断患者是否感染风疹病毒。不是所有逆转录-PCR 方法的敏感性都能达到标本直接检测的要求，可以稳定检测风疹病毒 3～10 个 RNA 拷贝数的方法才足够灵敏，例如，实时荧光定量 PCR。巢式逆转录-PCR 通常能满足此要求，尽管它们操作较复杂[143,146-147]。

许多出生后风疹感染患者在出疹前 4～5 天的 IgM 为阴性，在此期间最灵敏的方法是检测病毒 RNA[143]。例如，在出疹当天用实时荧光定量 PCR 直接检测风疹病毒 RNA 可以确诊风疹感染的患者数是商品化 IgM ELISA 方法的 2 倍。风疹病毒实时荧光定量 PCR 和逆转录-PCR 方法的标准化操作规程还未建立，目前已经有一些该类方法的检测在使用。

2. 病毒的分离和鉴定 从标本中分离培养风疹病毒可用于出生后风疹感染、CRS 和 CRI 的诊断(表 89-2)。出疹当天是理想的标本采集时间，在这一天采集的咽拭子标本通常是风疹病毒阳性，即使在出疹前 2 天采集检测阳性率会略高。咽部释放的病毒会很快消失，在出疹后 4 天仅 50%左右患者咽部病毒检测呈阳性。另外，病毒培养也用于 CRS 和 CRI 患者的病毒传播监测，目的是为了确定 CRS 和 CRI 患者隔离于密切接触者的结束时间。风疹病毒可以在多种细胞系中繁殖，包括 Vero、BHK21、AGMK 和 RK-13 细胞。组织培养遇到的问题是缺乏单次野生型病毒传代中产生 CPE 的细胞类型。历史上，利用风疹病毒会干扰细胞溶性肠道病毒如柯萨奇病毒 A9 的复制，即使这个难题解决了，但干扰实验很难维持[148]。现在在 CPE 缺失时利用逆转录-PCR、免疫荧光试验和免疫比色试验检测病毒 RNA 或病毒蛋白，从而可以鉴定病毒生长情况[147,149]。

当使用逆转录-PCR 从感染的组织培养细胞中检测病毒 RNA 时，对逆转录-PCR 方法的敏感性要求不是很严格，因为风疹病毒 RNA 的数量会通过感染组织细胞的传代而得到扩增(扩增约 10^6 倍)[118,147]。也可使用免疫荧光方法或免疫比色方法检测感染病毒的单层细胞。至关重要的是免疫荧光和免疫比色试剂背景值低，风疹病毒培养物不会产生高含量的子代病毒(实验株，如 f-Therien 可以达到约 10^7 PFU/ml 含量)。使用高质量的染色试剂有利于感染细胞的鉴定。标本可能需要适当稀释以使镜检是在同一个视野同时出现感染性和非感染性细胞。针对病毒蛋白 E1、E2 和 C 的单克隆抗体在免疫印迹试验(Western blot)中能与衰减和非衰减的抗原结合，在免疫荧光方法或免疫比色方法中效果也很好。

3. 病毒 RNA 序列的利用 直接从标本或组织培养物中扩增的核酸序列经测序可以提供有用信息。疫苗株病毒可通过测序与野生型病毒区分开来[150]。通过测序还能得到关于输入型风疹和 CRS 病例起源的重要信息[127,151]。消除长期积累的风疹病毒核酸序列信息，能对通过风疹病毒被消除的证据起到理论支持[152]。目前风疹 RNA 序列分析的应用存在 2 个主要的局限性：很多国家对于获取风疹病毒序列推动有限[153]；关于野生型病毒序列簇的分析和命名标准化信息有限[121]。这些局限性并非风疹病毒的生物学特性所致，可以通过更多的关注和努力来解决。

(七)血清学试验

1. ELISA 对于近期发作的出生后风疹感染疑似患者，通过 IgM 捕获 ELISA 试验或间接 IgM ELISA 试验检测风疹病毒特异性 IgM 是更快且最为经济的方法。仅有 50%出生后风疹感染患者的 IgM 在出现症状当天呈阳性(表 89-2)[143]。大多数生后风疹感染患者在出现症状后的第 5～40 天，用 IgM 捕获 ELISA 方法检测 IgM 呈阳性，从出现症状后的第 8 天开始，用间接 ELISA 方法检测 IgG 呈阳性(图 89-1)[154]。在出现症状后的 4～5 天 IgM 检测结果阴性的患者需要尽快再采集血清标本做检测，以免产生假阴性结果[129]。采集急性期和恢复期的双份血清，出现风疹病毒特异性 IgG 升

高4倍可诊断为出生后风疹感染。急性期血清应在发病后(1周内)尽快采集,恢复期血清应在发病后2～3周采。当用IgG滴度做诊断时,由于血清标本在单一稀释梯度测的光密度值不可靠,故应将血清标本做梯度稀释,比较每个稀释梯度的光密度值从而得出IgG量。

表89-2 风疹病毒感染生物标志物检测的采样时间[a]

诊断标准	多数患者检测结果呈阳性的适宜采样时间(%)	90%以上患者检测结果呈阳性的采样时间	检测阳性率会下降50%时的大概采样时间[b]
出生后风疹病毒感染			
咽部病毒[c]	出疹当天(90%阳性)	出疹前2天	出疹4天之后
ELISA检测血清中IgM[c]	出疹当天(50%阳性)	出疹5天之后	出疹6周之后
ELISA检测血清中IgG	出疹3天后(50%阳性)	出疹8天之后	终身
血标本病毒培养[d]	出疹当天(50%阳性)	出疹前5天	出疹1天之后
先天性风疹综合征[e]			
咽部病毒[c]	出生时(几乎100%阳性)	出生2周之后	3月龄时
ELISA检测血清中IgM	出生时(80%阳性)	1月龄时	6月龄时
ELISA检测血清中IgG[f]			

注:[a] 此表是为临床采样提供指导,表中所示的采样时间和阳性率是大概值。阳性率会随着检测方法敏感性的不同而变化。第三列所示的采样时间主要是为了帮助临床进行采样,并不一定是阳性率大于90%时的最早的时间。[b] 按给出的诊断标准,阳性率从最高下降到其50%时的采样时间。[c] 可选的标本有口腔黏膜渗出液(oral mucosal transudate,OMT)和干血斑(dried blood spot,DBS)。已对OMT检测病毒核和DBS检测IgM进行评估,具体见参考文献[63][64][143]和[144]。[d] 数据来自于参考文献[164]。[e] 这里涉及的是怀孕前3个月的胎儿感染。[f] 在风疹综合征患者中,随着母源性IgG的衰减和自身IgG免疫反应的成熟,在出生后的第一年,会出现高水平稳定的IgG或升高性IgG

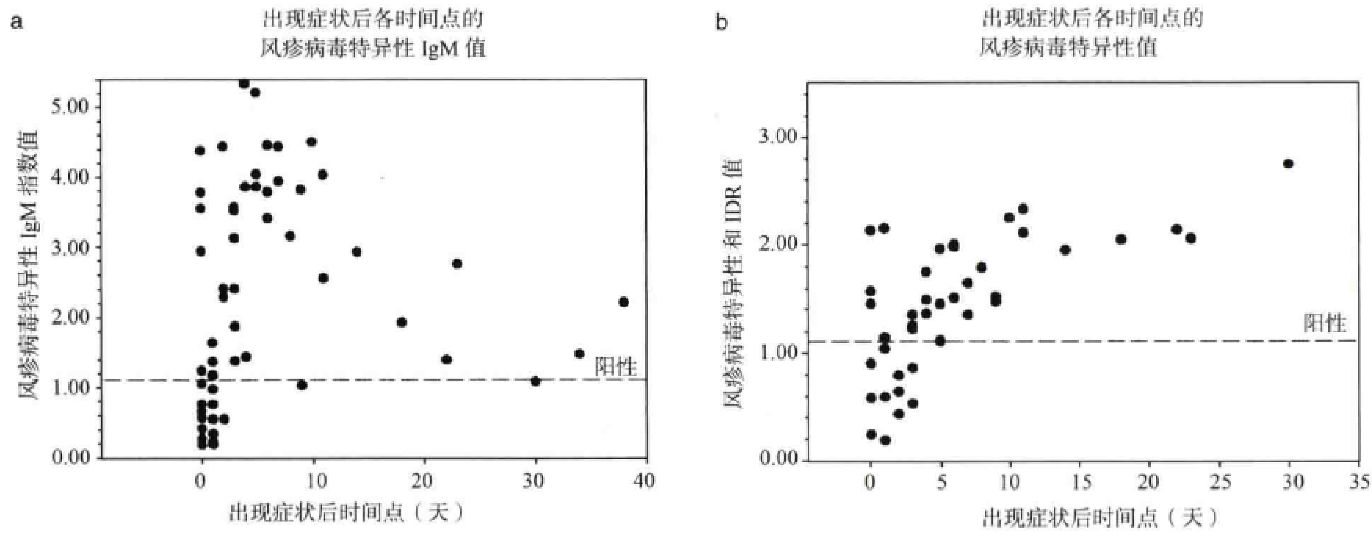


图89-1 用ELISA检测风疹病毒感染患者血清中风疹病毒特异性IgM和IgG的含量随时间的变化情况用商业的IgM捕获ELISA方法(a)和IgG间接ELISA方法(b)在出现症状(通常是出疹)后的各个时间点检测风疹病毒特异性抗体;抗体的指数值和ISR值是商业检测方法所设计,是血清标本光密度与标准品光密度的比值。视为阳性的最弱临界值用虚线指示。图中展示的是出现症状后在某天IgM检测结果为阳性的患者的数据

ELISA同样也可用于先天性风疹综合征的确诊。大多数先天性风疹感染婴儿从出生到1月龄期间的IgM可以被检出(表89-2),婴儿在1岁以内其体内IgM会逐渐消失,在1岁时大多数婴儿的IgM呈阴性。在CRS婴儿患者中,IgG免疫反应会在出生后的前9个月逐渐增强,同时母源性的IgG会逐渐消失。因此,在无接种疫苗或明显的出生后风疹感染风险因素的情况下,先天性风疹患者在出生后第1年内,其IgG会呈高水平或逐渐升高趋势。关于出生后风疹感染和CRS最佳标本采集时间的建议已有文献发表[129]。

2. 微珠分析与乳胶凝集试验 许多商品化的微珠分析(microbead assays)可用于风疹IgM和IgG抗体血清学分析。微珠分析与ELISA的原理一致,但前者实验表面使用的是微珠而非ELISA板条。微珠悬浮在液体中,可以作为液体或固体(过滤磁珠)进行高效且自动化的处理。自动微珠分析通常使用快速、灵敏的检测方法,如荧光抗体检测。

乳胶颗粒凝集检测试剂盒由包被了风疹病毒抗原的乳胶球组成。这些颗粒在风疹病毒特异性IgG或IgM存在时会发生凝集反应。

3. 空斑减少中和试验 PRN是在需要对抗血清的中和能力进行定量分析时所采用的检测方法。由于临床标本中的病毒毒株不产生CPE,故需要使用实验室病毒株(如f-Therien),实验流程与其他病毒检测相同。首先是将2倍或10倍稀释的抗血清和标准量的风疹病毒(通常为100～200 PFU)在含抑制损失蛋白(如含0.1%的牛血清白蛋白)的培养基或缓冲液中35～37 ℃共孵育1 h,再在4 ℃冰箱中孵育过夜。实验中需设仅含病毒的阴性对照组,因为在1 h的孵育期中空斑数量也会有减少。接着将上述病毒-抗血清标本加到单层融合生长的Vero细胞中在35 ℃中共孵育1 h,然后再将含琼脂或羧甲基纤维素的二乙氨乙基葡聚糖(100 μg/ml)的培养基(DEAE)铺在细胞表层,应添加小牛血清(1%),以维持细胞状态。6天之后,去除琼脂/羧甲基纤维素用中性红将细胞染色,也可用结晶紫染色,但使用结晶紫染色前需要清洗细胞以去除死细胞。免疫比色试验也可用于风疹病毒的检测[149]。空斑减少90%时抗血清的稀释倍数的倒数代表抗血清的中和能力。非免疫个体接种疫苗后和出生后风疹感染患者的抗体中和能力至少会增加100倍,比较容易用空斑减少中和试验确证是否曾暴露于风疹病毒。然而,当在不同实验室中开展PRN时,需要了解试验的精准信息,以定量比较抗血清的中和能力(如风疹病毒空斑形成能力在不同实验室之间可能会不同)。风疹病毒的CPE并不像麻疹病毒的CPE具有可复制性。

4. 其他血清学试验 IgM检测不能可靠地指示近期感染时(如在出现临床症状后数月才采集第一份血清标本),可用亲和力试验进行检测。抗风疹病毒IgG的低亲和力表明是近期感染[111,155-156]。这个试验是比较去垢剂或促溶剂将患者IgG和对照IgG与风疹病毒蛋白分离的能力。每次试验需设高亲和力和低亲和力的对照血清。亲和试验应用不广泛且操作差异大[157]。

由于出生后风疹感染和CRS的临床症状明显不同,故患者免疫反应存在显著差异并不令人惊讶。这些差异可以用免疫印迹试验指示,即CRS患者血清中抗体对风疹病毒糖蛋白的反应性常不同于出生后风疹患者[158]。这些检测方法使用不广泛,但有些临床诊断实验室将这些方法进行了改进[128]。

5. 出生前筛查 目前风疹实验室检测着重于对出生后风疹感染和先天性风疹感染进行鉴定。但在美国做风疹病毒检测更多的是通过对所有孕妇首次产前检测检查IgG进行风疹免疫情况筛查。风疹免疫的标准略有不同,有多种判断标准(分布范围为10～15 U/ml)[135]。常用的检测方法如ELISA标准化的阳性结果为10 U/ml,是美国风疹免疫的分界值[143]。在美国对风疹免疫的筛选大多是用微颗粒免疫分析法的全自动随机存取系统。

(八)结果的评价、解释和报告

因为IgM和IgG这2种免疫球蛋白通常能提供额外的有利于诊断的信息,出生后风疹感染疑似患者和CRS疑似患者应同时做IgM和IgG检测。例如,出疹后8天采集的血清标本检测结果为风疹病毒IgM阳性但IgG阴性,这与风疹免疫反应情况矛盾,在这种情况下IgM结果的准确性通常受怀疑(如与细小病毒抗体产生交叉反应)。风疹病毒IgG阳性但IgM阴性的结果与近期出生后风疹感染矛盾,原因是IgM免疫应出现得比IgG早且会在出疹后持续数周。

风疹病毒培养后需要用荧光定量 PCR 或逆转录-PCR 对培养物进行鉴定，也可用免疫荧光法或免疫比色法对感染细胞做鉴定，PCR 或免疫法阳性可判断为病毒细胞培养阳性，同时对照组细胞培养物应为阴性。当使用免疫荧光法或免疫比色法时，注意观察病毒蛋白在细胞内的分布情况(如当使用 E1 单克隆抗体时观察病毒 E1 蛋白的细胞内分布情况)[149]。

当用 PCR 方法直接检测标本中的风疹病毒 RNA 时，需要对检测结果进行评价。设多个阴性对照和对一个患者采多份标本可以增强直接逆转录 PC 阳性结果的可信度。由于假阴性率一般不能确定，阴性结果常难以判断。野生病毒的核苷酸易突变，当检测引物结合的病毒核苷酸发生突变时，检测引物与病毒基因组模板结合会不稳定，造成扩增失败或减弱，这是评估阴性结果时需要考虑的因素。当无法从患者身上采集血清标本或需要对血清学结果进行确证时，可用逆转录-PCR 方法对标本中风疹病毒 RNA 进行直接检测，这会比病毒培养快得多。

开展风疹病毒检测对于临床实验室来说是重大的负担。例如，当怀疑孕妇初次感染风疹病毒时，假阳性和假阴性检测结果会直接导致临床治疗方案错误[160]。因此，实验室要排除假阳性或假阴性。会导致相似临床疾病的其他病毒(如人细小病毒 B19)近期感染的检测也须谨慎。排除其他病毒感染情况下，风疹病毒阳性检测结果就更可信。标本重复检测及多种不同标本类型用不同方法检测(如血清学试验和病毒培养，表 89-2)，通常会产生一致的结果，这也可以消除假阳性结果。用 IgM 捕获 ELISA 法也会产生假阳性结果。例如有项研究表明，87 份用 IgM 捕获 ELISA 法检测为风疹病毒特异性 IgM 阳性的血清标本中，有 1 份最终诊断为人细小病毒 B19 初次感染[111]。假阴性结果可以通过采集患者多份标本进行排除(如间隔 1 周采血标本)。如果只有单个标本可用，就需要用多种方法对其进行检测。如当 1 份血清标本 IgM 检测为风疹病毒和人细小病毒 B19 双阳性时，可用 IgG 亲和试验可以区分风疹病毒和人细小病毒 B19 检测中 IgM 阳性结果[111,161]。

实验室需要注意孕妇产前的胎儿标本(如羊水)逆转录-PCR 结果局限性的解释，因为诊断妊娠伴 CRS 会对临床决定带来重大影响。通常情况下，风疹病毒 RNA 阳性胎儿的阴性检测结果的比例是未知的。当特定胎龄的宫内标本的逆转录-PCR 出现阳性结果，其 CRS 及无缺陷的 CRI 发生比率也是未知的。因此，无缺陷但伴有 CRI 的可能性的存在意味着阳性结果并不能确定胎儿出生后一定伴有缺陷。

出生后风疹病毒感染的临床症状与其他一些疾病类似，甚至可以出现无临床表现的情况。此外，其他疾病也会引起与 CRS 相似的出生缺陷特征。对出生后风疹感染和 CRS 的分类的最佳方法是依靠实验室检测结果而不仅仅是临床症状表现。出生后风疹感染患者可分为疑似(suspected)、极似(probable)、确诊(confirmed)或无症状感染；先天性风疹患者可分为疑似的 CRS、极似的 CRS、确诊的 CRS 和无症状感染。无症状感染、出生后风疹感染及 CRS 的准确分类需要实验室的阳性检测结果。临床、实验室及流行病学信息(如跨国旅行)均可纳入最终临床结论的考量。分类标准和指南的完整描述需要进一步探讨[129]。某个特异性的诊断状态需要引起注意。由于会有假阳性的可能性，对孕妇不宜用包括风疹病毒 IgM 在内的系列检测来决定孕妇的对风疹免疫状况；免疫状态用 IgG 检测。标准的 TORCH(弓形体病、风疹、巨细胞病毒、单纯疱疹病毒和其他病原体感染)组合检测包括了风疹病毒 IgM 检测，但不能用于确定免疫状态。

对近期关于风疹病毒感染相关疾病问题的回复：

风疹病毒不仅可以导致 CRS 的持续性感染。近期发现免疫缺陷人群的 Fuch 葡萄膜炎及肉芽肿与风疹病毒核酸或病毒的长期存在有关[162-163]。尽管风疹病毒与这些感染细节的因果关系尚待确定，但与风疹持续感染有关的全部疾病范畴显然尚未明确。

本章节的发现与结论主要来自作者，并不一定代表 CDC 的观点。本章提及使用的商品并不意味着已经获得美国卫生和公共服务部(U. S. Department of Health and Human Services)的认可。

参考文献请扫二维码查阅

第90章　肠道病毒和副肠孤病毒

KATHLEEN A. STELLRECHT, DARYL M. LAMSON, JOSÉ R. ROMERO

（徐春晖　译；韩晓旭、汤一苇　审校）

一、分类

肠道病毒(enteroviruses,EV)是小RNA病毒科(*Picornaviridae*)成员，“细小”(pico)意思是很小，“rna”表明其基因组为RNA，“viridae”表示病毒。EV传统的分类学与亚群鉴定标准是基于病毒在细胞中的复制方式、引起的临床综合征或疾病，以及在乳鼠中的疾病表现。肠道病毒按亚群可分为脊髓灰质炎病毒(poliovirus,PV)、柯萨奇病毒A(coxsackievirus A,CVA)、柯萨奇病毒B(coxsackievirus B,CVB)和埃可病毒(echovirus,E)。埃可病毒的名字“echo”是“enteric cytopathic human orphan”(致肠道细胞病变人孤儿)的首字母缩写，原因是埃可病毒最初是从无症状儿童的粪便中被分离出来，且在病毒培养中会引起细胞病变效应。至20世纪60年代确定人肠道病毒分类标准时，共发现67种不同血清型，此后发现的血清型均以肠道病毒后面再接一个数字进行命名(新发现的就是68，依此类推)[1-2]。

随着分子测序的发展，以及受可用的抗血清在新病毒株和变异株鉴定中的限制，传统的分类学方法面临着挑战。系统进化分析对肠道病毒的分类标准进行了有效的重新定义[3]。目前，主要引起人类疾病的人肠道病毒分为7个种：肠道病毒A～D和鼻病毒(rhinoviruses,RVs)A～C(表90-1)[4]。最初认为是不同血清型的多个肠道病毒为同一病毒株的不同突变体[5]，有些肠道病毒重新分入了不同组[6]。此外，一些新的肠道病毒被鉴定出来(EV73～EV121)(http://www.picornaviridae.com/enterovirus/enterovirus.htm)[7]。对于命名的改变，已经从肠道病毒属中删除了宿主的名称，且所有已分类的肠道病毒名称中均包含了种名(如EV-B111)。

最初在1956年埃可病毒22和埃可病毒23根据其生长特征被归为肠道病毒属成员，但后来发现其在遗传学与其他肠道病毒有明显不同，分别被重新归类命名为副肠孤病毒1(HPeV1)和副肠孤病毒2(HPeV2)[9-11]。副肠孤病毒3(HPeV3)是在十年之后用分子生物学方法鉴定出来的[12]。与肠道病毒基因分型的方法类似，副肠孤病毒也采用病毒的*VP*1基因序列作为基因分型标准[13-14]。

副肠孤病毒属包括2个种：副肠孤病毒A(PeV A)(即之前的HPe V)和副肠孤病毒B(PeV B)(即之前的Ljungan病毒)；此外，副肠孤病毒种名称已经去除宿主名称。共同名称保持一致以区分不同种的名称(表90-1)。副肠孤病毒A(PeV A)包含19种不同的型别：HPeV 1～HpeV 19；PeV B包括5种型别：LV1～5(http://www.picornaviridae.com/parechovirus/parechovirus.htm)。

分子生物学技术基于*VP*1基因序列分析已经对多种型别的副肠孤病毒(Pe V)进行鉴定。病毒全基因组序列分析技术发现了多种新的型间重组副肠孤病毒病毒株[15-19]。这并不意外因为重组对于副肠孤病毒株的进化起到一定作用[20]。更多的全基因组序列数据信息有助于破译新型重组病毒、识别常见的重组断点及型间重组及更好地了解副肠孤病毒之间的进化联系。

表 90-1 人类感染相关的肠道病毒、鼻病毒、副肠孤病毒

病毒	种名	血清型、分型、常用名[a]
肠道病毒(EV)	肠道病毒 A(20 型)	
	柯萨奇病毒(CV)	CV-A2-A8, A10, A12, A14, A16
	肠道病毒(EV)	EV-A71, A76, A89-A91, A114, A119-A121
	肠道病毒 B(59 型)	
	柯萨奇病毒(CV)	CV-A9, B1-6
	埃可病毒(E)	E1-7, 9, 11-21, 24-27, 29-33
	肠道病毒(EV)	EV-B69, B73-B75, B77-B88, B93, B97, B98, B100, B101, B106, B107, B111
	肠道病毒 C(23 型)	
	柯萨奇病毒(CV)	CV-A1, A11, A13, A17, A19-A22, A24
	脊髓灰质炎病毒(PV)	PV1-3
	肠道病毒(EV)	EV-C95, C96, C99, C102, C104, C105, C109, C113, C116-118
	肠道病毒 D(4 型)	
	肠道病毒(EV)	EV-D68, D70, D94, D111
鼻病毒(RV)	鼻病毒(RV)A(80 型)	RV-A1, A2, A7, A9-A13, A15, A16, A18-A25, A28, A30-A34, A36, A38-A41, A43-A47, A49-A51, A53-A68, A71, A73-A78, A80-A82, A85, A88-A90, A94, A96, A98, A100-A109
	鼻病毒(RV)B(30 血清型)	RV-B3-6, B14, B17, B26, B27, B35, B37, B42, B48, B52, B69-70, B72, B79, B83-84, B86, B91-93, B97, B99-104
	鼻病毒(RV)C(55 型)	RV-C1-55
副肠孤病毒(PeV)	副肠孤病毒(PeV) A[b](19 型)	HPeV A1-19
	副肠孤病毒(PeV) B(1 型)	Ljungan (LV) 1

注:[a] http://www.picornaviridae.com/enterovirus/enterovirus.htm。[b] http://www.picornaviridae.com/parechovirus/parechovirus_a/parechovirus_a.htm(译者注:英文版本表格中缺 b,已按照网址补充)

二、病原体的描述

与小 RNA 病毒科的其他成员相似,肠道病毒是体积小(在水化状态下直径 30 nm)、无包膜病毒,其基因组为单股正链 RNA,其在氯化铯中的浮力密度为 1.30~1.34 g/cm³[4]。肠道病毒 A~D 中的绝大多数成员在酸、乙醚和氯仿中能保持稳定,对非离子去污剂不敏感,但加热(>56 ℃)、紫外线照射、氯化物和甲醛可以灭活肠道病毒。绝大多数肠道病毒在细胞中复制繁殖的最适温度一般为 36~37 ℃,仅鼻病毒 A 和鼻病毒 B 是例外,它们的最适合繁殖温度为 33 ℃。关于鼻病毒的更详细内容请见第 91 章。

肠道病毒在液态环境中能保持稳定,在水、体液和污水中能存活数周,这是由于由肠道病毒的多种特性,包括在二价阳离子存在时能保持热稳定性、耐酸和没有脂质包膜。

肠道病毒 RNA 基因组是病毒蛋白翻译和 RNA 复制的模板链(图 90-1)[21]。病毒基因组含长约 750 bp 的 5′非翻译区(5′non-translated region,5′NTR),紧接 5′NTR 的是单个可读框(open reading frame,ORF)(图 90-1)。ORF 首先被翻译成单个多聚蛋白,随后被剪切为数个功能性中间体,最后在病毒编码的蛋白酶作用下被酶解为 11 个病毒蛋白。紧邻 ORF 的下游是长 70~100 bp 的 3’ NTR,末端是多聚腺嘌呤尾巴。

肠道病毒 5′NTR 和 3′NTR 在病毒生命周期中有重要作用。5′NTR 含有多个预测性的高阶结构域(如茎环结构或结构域)。5′NTR 的 5′末端结构域是病毒 RNA 复制所必需的。肠道病毒基因组翻译不依赖帽子,而是受内部核糖体进入位点(internal ribosome entry site,IRES)调控,IRES 是病毒 5′NTR 一段非连续的核苷酸区域。对于脊髓灰质炎病毒和多个非脊髓灰质炎肠道病毒(non-polioenteroviruses,NPEVs)而言,5′NTR

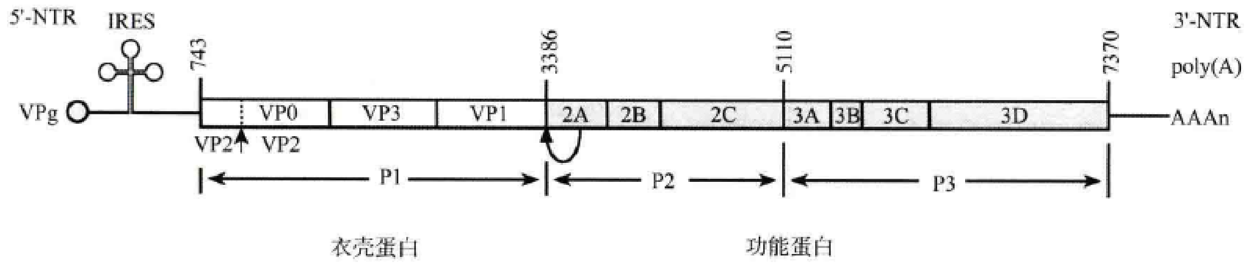


图 90-1　脊髓灰质炎病毒 1 型基因组结构。脊髓灰质炎病毒基因组是单股正链 RNA，长约 7500 个核苷酸。第 743～7370 个核苷酸位于一单独可读框，编码衣壳蛋白(图中 P1 白框区)和功能蛋白(图中 P2 和 P3 灰框区)。5′NTR 和 3′NTR 在两端用线条表示，核糖体进入位点(IRES)用二维模式图显示。病毒蛋白 VPg 与 5′NTR 末端的尿嘧啶通过共价键连接。根据参考文献[21]再版

被证实是病毒毒力表型和细胞特异性的决定因素[22-23]。由于 5′NTR 功能的重要性，在肠道病毒基因组中，此区域的核苷酸序列接近绝对保守。这部分保守的核苷酸序列被开发设计成检测肠道病毒的引物和探针。而 3′NTR 也被证明在病毒 RNA 复制中发挥作用。

病毒粒子的衣壳由 60 个重复的原体单元组成，构成呈 20 面体结构的病毒颗粒(virion)(图 90-2)[21]。VP1、VP2 和 VP3 构成病毒毒粒的表面，它们形成 8 股"β 桶状"核心结构。连接 β 链的外部环形氨基酸序列为肠道病毒提供了不同的表面结构和抗原多样性。一个原体中一般有 3 或 4 个中和位点，大多数成簇聚集在 VP1 上。VP4 位于衣壳内部，不存在表面暴露的区域。

多数人类小 RNA 病毒的近原子分辨率结构解析显示肠道病毒(和鼻病毒)共享多个保守的结构基序(structural motifs)。每个五聚体单元(如五个原体)的五重对称轴中有保守性的凸起结构，环绕这个凸起结构的是一条狭窄的深裂缝(25Å)或深峡谷。峡谷结构是肠道病毒进入敏感性宿主细胞时特异性细胞受体的结合位点。

副肠孤病毒的基因组组成结构与肠道病毒类似，不同之处在于副肠孤病毒只有 VP0、VP3 和 VP1 三种衣壳蛋白，VP0 不像肠道病毒那样被酶解为 VP2 和 VP4。此外副肠孤病毒的 IRES 与心脏病毒和口蹄疫病毒更为类似，而与肠道病毒有差异[24]。副肠孤病毒直径为 28 nm，与已知的其他小 RNA 病毒属成员大小相似，只是病毒表面更为平滑[25]。病毒基因组相似性分析结果显示副肠孤病毒与细小 RNA 病毒属其他成员均有典型的 β 桶状核心结构。与肠道病毒相比，副肠孤病毒被

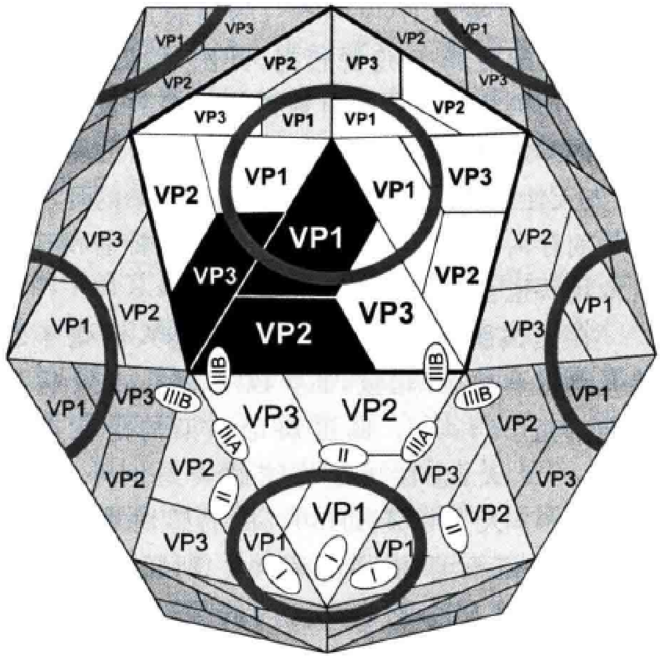


图 90-2　脊髓灰质炎病毒毒粒的三维结构和 4 个中和性抗原位点示意图。肠道病毒二十面体衣壳是由 60 个原体(protomers)组成，每个原体含有衣壳蛋白 VP1、VP2 和 VP3(黑色区域所示)。12 个五倍折叠中的每一个对称轴都是被 5 个原体所环绕，组成一个五聚体(黑色加粗实线环绕所示)。病毒特异性受体的附着位点在五倍折叠对称轴周围的凹陷处，也被称为峡谷(灰色圆环所示)。每个暴露在病毒表面的衣壳蛋白都含有可与中和抗体结合的免疫显性的抗原位点。4 个中和性抗原位点位于表面环形延伸处(白色椭圆形所示)。来自参考文献[21]

预测具有更平滑的表面结构(见冷冻电镜拍摄图片)，具有由病毒外部的环形结构域决定的抗原性变异，这与肠道病毒一致。

三、流行病学和传播

肠道病毒和副肠孤病毒是全球范围内存在的致病病原。在温带气候地区，大部分肠道病毒感染（占70%～80%）发生在夏季和秋季。在热带气候地区，肠道病毒感染在全年都会发生，雨季发病率会上升。不同血清型的副肠孤病毒发病率存在季节性差异。副肠孤病毒3型感染主要发生在春季和夏季，而副肠孤病毒1型在全年流行，但在夏季发病率最低[24,26-27]。

在全球范围内每年感染肠道病毒的患者估计约有10亿甚至更多，其中美国每年约有3000万～5000万肠道病毒感染患者[28]。除了严格的呼吸道病毒株如EV-D68[29]，肠道病毒和副肠孤病毒主要通过粪-口途径传播，其次是通过呼吸道飞沫和污染物传播。粪口传播绝大多数发生在卫生条件差的地区。有报道肠道病毒可通过胎盘传播（先天性）[30]。肠道病毒可以在被污染的环境表面长期存活而达到传播目的。医院育婴室和其他机构场所也会暴发肠道病毒感染。

在美国肠道病毒最主要的感染人群是年幼婴儿和5～10岁儿童，1岁以下婴儿占发病患者数的近50%[31]。肠道病毒感染的潜伏期一般为3～6天，急性出血性结膜炎是例外，潜伏期为1～3天[32]。超过50%的易感性家庭成员会发生肠道病毒继发感染[33]。副肠孤病毒最主要的感染人群是1岁以内的婴幼儿，其中6个月以下婴儿所占比例最高[34-36]。此外，有研究显示感染不同型别副肠孤病毒的婴儿其平均年龄存在差异，副肠孤病毒3型感染主要发生在年龄更小的婴儿中[24]。

1970－2005年，肠道病毒流行方式主要有2种：大范围流行（如E9、E13、E30和CVB5）和地区性流行（如CVA9、CVB2、CVB4和EV71）[31]。大范围流行的肠道病毒的血清型在一段时间内变化幅度较大，偶尔会出现发病率上升的趋势。地区性流行的肠道病毒的血清型较为固定，流行程度较低，发病率变化较小。5种最常见的血清型（E9、E11、E30、E6和CVB5）占报告病例48.1%。美国在2009—2013年间，柯萨奇病毒6型和副肠孤病毒3型是流行的肠道病毒中最主要的血清型，各占报道病例的12.3%，其中大部分柯萨奇病毒6型流行于2012年[37]。2012年94%的副肠孤病毒3型是由一家常规检测副肠孤病毒的机构分离检出的。

一般而言，肠道病毒感染患者的死亡率较低，据报道为3.3%。感染CVB4和HPeV1的死亡风险较高，而感染E9的死亡风险则较低[31]。

全球根除脊髓灰质炎计划始于1988年，截至2015年，全球消灭脊髓灰质炎认证委员会（Global Commission for the Certification of the Eradication of Poliomyelitis）宣布已经消灭了野生型脊髓灰质炎病毒2型[38]，截至2016年，在除阿富汗、尼日利亚和巴基斯坦以外的全球范围内，野生型脊髓灰质炎病毒1型和3型的地区性流行已得到有效控制[39]。全球根除脊髓灰质炎的努力使该种疾病发病率下降了99.9%，从每年估计35万的病例下降至2016年的37例[39]。

四、临床意义

肠道病毒和副肠孤病毒可引起多种形式的局部和全身感染，会影响所有年龄段患者的器官系统（表90-2）。一般而言，没有哪种疾病与某个特定的病毒血清型唯一相关，也不会有某个病毒血清型与任何一种疾病唯一相关。这个结论甚至对于麻痹型脊髓灰质炎也是成立的，这种疾病与多种非脊髓灰质炎肠道病毒血清型相关。然而，肠道病毒不同血清型与不同年龄段的重症患儿（或）死亡患儿相关[40]。同样，副肠孤病毒3型与更加严重的疾病相关[13,24,34,41]。脑炎及由高热、严重易怒、心动过速、灌注不良、红皮病、腹胀及肝炎组成的脓毒症样综合征更常与副孤肠病毒3型感染有关。

肠道病毒感染和副肠孤病毒感染多无临床症状，最常见的症状是急性非特异性发热伴随或不伴随出疹。这个所谓的病毒综合征是婴幼儿发热最为常见的重要病因之一。虽然这种发热性疾病本身是良性的，但由于它与婴幼儿其他严重疾病相似，故需要密切关注。仅根据临床症状表现难以将肠道病毒和副肠孤病毒感染与常见细菌感染和其他病毒感染区分开来，因此会导致不必要的治疗。在夏季和秋季，急性发热住院的婴幼儿病因评估中，肠道病毒感染占50%～60%[33]。

表 90-2　与肠道病毒和副肠孤病毒感染相关的临床症状

器官系统	疾病
神经系统	无菌性脑膜炎、脑炎、急性迟缓性脊髓炎
呼吸系统	普通感冒、口炎、手足口病、疱疹性咽峡炎、淋巴结性咽炎、扁桃体炎、鼻炎、毛细支气管炎、支气管炎、肺炎
心血管系统	心肌炎、心包炎
其他	急性出血性结膜炎(AHC)、胸膜痛(流行性胸膜痛)、发热伴出疹性疾病、新生儿脓毒症

迄今医生遇到的最严重的肠道病毒/副肠孤病毒临床综合征是无菌性脑膜炎。在美国，肠道病毒是脑膜炎最主要的致病病原体，80%以上病毒性脑膜炎的病原体是肠道病毒[42-43]。最近研究显示副肠孤病毒 3 型会导致相当数量的 2 岁以下婴幼儿患新生儿脓毒症和无菌性脑膜炎[24,34-36,44]。肠道病毒和副肠孤病毒感染常为突然起病，常见症状包括发热、头痛，偶有畏光、呕吐、出疹和肌痛。年幼儿童患者的症状还有发热、嗜睡和厌食[35]，与细菌感染相似。目前治疗方法主要是支持治疗，通常 1 周后症状缓解，不会留下长期的后遗症。每年有 3 万～5 万非脊髓灰质炎肠道病毒脑膜炎患者因病住院。埃可病毒和柯萨奇病毒 B，特别是其中的 E4、E6、E9、E11、E16、E30、CVB2 和 CVB5，是与此综合征相关的主要肠道病毒。

脊髓灰质炎这个术语来源于脊髓前角细胞感染造成的炎性损伤，临床上表现为一块或多块肌肉急性发作的下运动神经元麻痹。在疫苗未问世的时代，患者死亡率为 5%～10%[6,45]，在近期的流行中，死亡率则高达 48%[46]。历史上，这种疾病的最常见病原体是脊髓灰质炎病毒，但目前绝大多数国家的情况已非如此。在消灭了脊髓灰质炎病毒的国家和地区，非脊髓灰质炎肠道病毒、副肠孤病毒和流行性疫苗衍生脊髓灰质炎病毒(circulating vaccine-derived PVs，cVDPVs)是急性迟缓性脊髓炎(acute flaccid myelitis，AFM)的主要致病病原。流行性疫苗衍生脊髓灰质炎病毒是脊髓灰质炎病毒疫苗株(Sabin)衍生而成的流行株，它重新获得了致麻痹型脊髓灰质炎的致病能力，至少已有 6 次脊髓灰质炎暴发是由于流行性疫苗衍生脊髓灰质炎病毒引起的[1-2]。需要强调的是，尽管开展了根除脊髓灰质炎的行动，但脊髓灰质炎病毒仍在一些国家流行，这些病毒可作为存储库再次向其他地区引入脊髓灰质炎病毒。

多种非脊髓灰质炎肠道病毒血清型可导致急性迟缓性脊髓炎，尤其是 EV71 型。2014 年秋季，世界范围内多起急性迟缓性脊髓炎病例报道，与此同时 EV-D68 型引起严重下呼吸道感染的大规模暴发，且主要见于儿童。美国共报道 1153 例严重呼吸系统疾病确诊病例及 107 例急性迟缓性脊髓炎病例[47]。部分瘫痪儿童患者鼻咽部拭子中检测到 EV-D68 感染。更为复杂的是，在部分儿童患者中也检测到了其他病原体感染的迹象，其中包含一些混合感染。尽管和 2014 年的程度不同，急性迟缓性脊髓炎发病率与 EV-D68 呼吸道感染发病率均呈上升趋势的模式在 2016 年秋季再次出现。和之前急性迟缓性脊髓炎聚集性病例相似，并未在所有标本中检测到一致的病原体[47]。由于引起急性迟缓性脊髓炎的病原学尚未确定，疾病控制中心强调扩大急性迟缓性脊髓炎的检测，包括感染性及非感染性病因(https://www.cdc.gov/acute-flaccid-myelitis/faqs.html)。脑炎病因学研究显示，肠道病毒占致病病原体的 3%～5%，占病毒性脑炎致病病原体的 27%～37%[48-49]。肠道病毒 B 种与肠道病毒 A 种的部分血清型成员是引起该综合征的主要的亚群[33,48-50]。有证据表明副肠孤病毒也是病原体，尤其在新生儿中[41]。每年脑炎病例中由副肠孤病毒引起的数量尚不明确。最近有研究显示副肠孤病毒引起的脑炎与严重的神经发育后遗症有关[51]。亚太地区多个国家的幼儿感染肠道病毒 71 与菱脑炎有关(rhombencephalitis)，菱脑炎是一种严重的脑干脑炎，通常是致命的[52-54]，这种病例在美国也有报道[55]。丙种球蛋白缺乏血症患者会发生慢性肠道病毒脑膜脑炎，其最主要的致病病原是埃可病毒，特别是 E11。

心肌炎曾经是一种与肠道病毒相关的致命的疾病，但医疗条件的改善已使死亡率降低到 10% 左右。疾病症状包括非特异性症状(发热、肌痛、心悸或劳累性呼吸困难)、暴发性血流动力学崩溃和猝死。8.6%～12% 的心源性猝死的青壮年患者与心肌炎相关[56-57]。1/3～1/2 急性心肌炎和心包炎病例的致病病原是柯萨奇病毒 B[58]，其中柯萨奇病毒 B2 和柯萨奇病毒 B5 是最主要致病血清型。埃可病毒和脊髓灰质炎病毒也与心肌炎相

关,但相关性不如柯萨奇病毒 B 显著。

新生儿系统性疾病与子宫内感染肠道病毒和副肠孤病毒有关,发病时间是围产期或出生后 2 周内[24,30]。这种综合征累及多个器官,症状包括嗜睡、喂食困难、呕吐、心动过速、呼吸困难、发绀、黄疸、腹泻、伴随发热或不发热。典型的新生儿系统性肠道病毒疾病通常与两种严重的临床表现相关(尽管婴儿可能还会有多种联合症状或累及器官系统):心力衰竭和出血-肝炎综合征,伴有肝衰竭和弥散性血管内凝血[24,30,40]。发病率和死亡率与该综合征显著相关,死亡发生迅速。柯萨奇病毒 B 与埃可病毒,特别是血清型 11 往往与该综合征相关。然而,其他肠道病毒与副肠孤病毒也可引起新生儿系统性疾病。

尽管持续性、致命性的肠道病毒感染最初是在丙种球蛋白缺乏血症患者中报道的,但这种情况也会在其他免疫缺陷患者中发生,如重症联合免疫缺陷病、低丙种球蛋白血症、高免疫球蛋白 M 综合征及骨髓、实体器官移植受体人群。临床症状几乎总是包括脑膜脑炎。接受抗 CD20(美罗华、奥滨尤妥珠单抗)单抗治疗的患者发生严重肠道病毒感染的风险增高。

最初发现手足口病与柯萨奇病毒 A16(CVA16)相关,但与脊髓灰质炎病毒和柯萨奇病毒 A16 有亲缘关系的肠道病毒 71(EV71),是亚太地区手足口病大规模暴发疫情并导致神经和系统性并发症的病因[61]。神经系统症状包括无菌性脑膜炎、急性迟缓性脊髓炎和脑干脑炎,伴随全身系统性症状如严重的肺水肿和休克。虽然全球都有 EV71 感染引起的重症疾病的报道,但在亚洲发生率更高,造成这种地区分布差异的原因仍然未知,可能与病毒株差异或人宿主 HLA 抗原有关[61]。目前,疱疹性咽峡炎相关的 CVA6 被认为与美国非典型手足口病暴发疫情相关[62]。

上呼吸道体征和症状与多种肠道病毒性综合征相伴随。肠道病毒是上呼吸道和下呼吸道综合征的致病病原(如夏季感冒、咽炎、扁桃体炎、喉气管支气管炎、毛细支气管炎和肺炎)[55,63-64]。肠道病毒在病因学上与 15%以上的上呼吸道综合征病例相关[64]。核酸扩增检测的结果表明,在不同国家 19%以上住院儿童的下呼吸道感染的致病病原是肠道病毒[65-66]。已从肺炎或其他呼吸道疾病的患者体内分离到多种肠道病毒 C 型病毒株(C104、C109、C117)[67-70]。

近年来,肠道病毒 D68(EV-D68)被鉴定为呼吸系统疾病的病原体。1962 年首次从 4 例患肺炎和毛细支气管炎儿童的标本中分离到 EV-D68[71],此后(包括近期)绝大多数 EV-D68 病毒株都是从感染散发、聚集或流行情况下患者呼吸道标本中分离得到[70,72-77]。EV-D68 是肠道病毒中特殊的表型,它不耐酸,在 37 ℃时病毒复制不稳定,这种特征与鼻病毒类似[21,68-69]。此外,EV-D68 过去并不常见[70,75,77],美国 CDC 发布的 36 年来非脊髓灰质炎肠道病毒分离株的回顾分析显示,52 812 个病毒分离株中仅有 26 个是 EV-D68[80]。对全球各地分离的 EV-D68 病毒株的系统进化分析结果显示,在过去 20 年 EV-D68 出现多个亚型并快速传播[80],可能是造成球范围内聚集和流行报道增多的原因[72-76,81]。

临床症状明显的下呼吸道疾病主要发生在婴幼儿[72-77,81],但青少年和成人患者也有报道[70,72,75]。有 70%～80% 的患者会有基础症状,如哮喘或哮鸣[72,81]。已报道的与 EV-D68 相关的临床综合征包括肺炎、毛细支气管炎、喘息性支气管炎、气喘发作和哮鸣[73-74,76-77]。肺部体征和症状包括咳嗽、哮鸣音、呼吸困难、心动过速及肋间和肋下凹陷[72-73,76,81]。令人惊讶的是有 1/2～3/4 的儿童不发热。患者出现缺氧以致需要补充氧气的情况很常见,严重时需要住院进行重症监护。部分儿童需要双相气道正压通气、机械通气甚至进行体外膜肺氧合,死亡患者少见,但也有报道。X 线胸片表现为浸润和肺不张。

其他明显的急性临床肠道病毒综合征还包括急性出血性结膜炎(主要由 EV70 和 CVA24 变异型引起)、疱疹性咽峡炎和胸膜痛(博恩霍尔姆病)。研究数据表明,肠道病毒与一些慢性疾病有关联,包括肌萎缩侧索硬化、慢性疲劳综合征、多肌炎、先天性脑积水和注意力缺陷(伴多动),但这种因果关系仍缺乏确凿证据[82]。但最近研究强调了肠道病毒与 1 型胰岛素依赖型糖尿病之间可能的关联性,尽管个体遗传因素也起到重要作用[83-85]。

一般而言,副肠孤病毒感染导致的疾病谱与肠道病毒相似[24]。腹泻或呼吸道症状可单独存在,也可联合其他综合征一起出现。虽然副肠孤病毒作为流行性腹泻的病原体仍缺乏证据,但是确与腹泻的地方性病例相关[24]。虽然已有呼吸系统疾病暴发的报道,但副肠孤病毒在地方社区呼

吸道疾病中发挥的作用尚缺乏数据。在一项针对2200例有呼吸道症状患者的队列研究中，仅从1.2%的呼吸道标本中检测到副肠孤病毒[86]。与新生儿肠道病毒性败血症一样，副肠孤病毒（特别是3型）感染也可引起急性弛缓性脊髓炎、无菌性脑膜炎、脑炎和心肌炎。有趣的是，在近期研究中发现，以前被认为仅感染啮齿类动物的一种副肠孤病毒——永安河病毒（Ljungan virus）与人类的胎儿宫内死亡存在关联[87]。

五、标本的采集、运输和存储

由于肠道病毒通常存在无症状排毒，尤其是通过粪便，故选择合适的标本对于肠道病毒感染的诊断十分重要。标本的收集应与临床综合征相对应（表 90-3）。典型情况下，肠道病毒感染后最初是在呼吸道或胃肠道的上皮细胞及小肠的淋巴滤泡中复制，接着会引起病毒血症，导致次级组织的感染。因此，对无菌性脑膜炎患者，脑脊液通常是合适的标本，但在病程早期血清（血浆）标本的检测结果更佳[88-92]，并且血清（血浆）标本也是新生儿脓毒症唯一能选择的标本类型[91]。值得注意的是，至少在儿童患者中，对于肠道病毒和副肠孤病毒的检测阳性率来说，血和脑脊液标本高于鼻咽部标本[93-94]。此外，如果脑脊液标本是在出现症状2天后获得的，其诊断价值降低[95]。

表 90-3　肠道病毒和副肠孤病毒感染性疾病和相应标本的选择

疾病名称	标本的可接受性[a]					
	咽喉[b]	直肠/粪便[b]	血清	脑脊液	组织	结膜
无菌性脑膜炎			±	+		
脑炎	+	+	±	±		
急性迟缓性脊髓炎	+	+	±			
呼吸系统疾病	+					
心肌炎					+	
AHC[c]						+
发热性疾病			+			
新生儿败血症			±			

注：[a]"+"，标本适用于检测；"±"，标本可能适用于检测。[b]特异性较低。[c]急性出血性结膜炎

由于儿童患者尤其是婴儿的脑脊液标本通常不会出现细胞计数增高，故不建议对脑脊液标本进行细胞计数增高（淋巴细胞计数增高）的初筛[96-99]，而成人患者情况可能相反[100]。同样脑脊液中出现中性粒细胞数量占优势的情况仅会在疾病的早期阶段出现几个小时。另一方面，即使肠道病毒性脑炎患者脑脊液标本出现细胞计数增高，其PCR检测结果也常为阴性。对于这部分患者，可以选择咽拭子和（或）直肠拭子进行检测。然而，肠道病毒与副肠孤病毒与咽部和胃肠道长时间无症状脱落有关[101-105]，这些部位检出肠道病毒和副肠孤病毒并不一定能证明病因。此外，由于双重感染，从无菌部位检出的病毒会与咽部和直肠拭子检出的病毒有10%～20%的差异[106]。有必要指出的是，对于急性迟缓性脊髓炎患者推荐在出现麻痹症状后的前14天内间隔24h以上采集双份便标本[1]（https://www.cdc.gov/acute-flaccid-myelitis/hcp/instructions.html）。

对于心肌炎和心包炎患者，心肌组织被认为是诊断标准[107-108]。非1岁以内的婴儿，血标本PCR检测结果几乎均为阴性[47,92,109-111]。对于疱疹性咽峡炎和手足口病患者，水疱液是病毒检测的理想标本，同时采集多个疱疹中的液体会增加标本的病毒含量。对于急性出血性结膜炎患者，结膜拭子为最优标本[1]。

妥善使用病毒转运培养基进行转运和保存为最优标本。但因肠道病毒在液体环境中很稳定，可以在水、体液和污水中存活数周，因此肠道标本一般不需要快速转运。事实上，肠道病毒在室温可存活7天，在−20℃～4℃条件下可存活长达一年[112]。推荐−70℃长期保存以防病毒RNA降

解，并可长时间（数年）保持对培养细胞的感染活性。

特定临床标本（如粪便标本）在进行细胞接种前需要进行处理。采用病毒核酸扩增检测时，对标本的处理过程要注意维持病毒衣壳的完整性，目的是防止肠道病毒的RNA基因组被体液和环境中广泛存在的核酸酶降解破坏。标本应避免反复冻融。由于肠道病毒固有的环境稳定性，放置于临床实验室冰箱中的残留标本也可用于肠道病毒核酸检测。进行过生化或血液全自动分析的标本由于可能会与其他标本产生交叉污染，应谨慎用于肠道病毒检测。进行抗体检测的血清最好间隔2～4周、分别在急性期和恢复期采集。采集后的血清应在－20 ℃冻存，同一时间做检测。

六、直接检测

显微镜检查

1. 抗原检测 历史上，由于肠道病毒被认为是仅与自限性上呼吸道感染相关，故还未采用免疫荧光技术检测由肠道病毒导致的呼吸系统感染。

2. 核酸检测 目前，核酸扩增检测（nucleic acid amplification tests，NAATs）是肠道病毒和副肠孤病毒的优选检测方法。细胞培养由于耗费时间过长（肠道病毒培养耗时最长达10天，副肠孤病毒培养耗时最长达21天）不适用于临床检测。肠道病毒C种中的一些血清型（如CVA1、CVA19和CVA22）和副肠孤病毒7～16不能在培养细胞中繁殖或繁殖能力尚不明确。一些标本类型（如25%～35%脑脊液标本）所含的病毒滴度很低而不适用于培养分离方法[113]。此外，研究表明核酸扩增检测更有利于肠道病毒感染患者的护理。临床结局研究表明，检测结果所需的时间与患者住院时间呈相关性[96,114-115]。当肠道病毒感染阳性检测报告在24 h内发出时，患者的抗生素使用就会减少，辅助检查也会减少，住院时间会缩短，同时住院费用也会降低[114-118]。

核酸扩增检测（逆转录-PCR或基于核酸序列的扩增）是灵敏、特异、快速、通用且临床适用的肠道病毒检测方法[119-121]。脑脊液的核酸扩增检测比细胞培养分离方法敏感性高，可达65%～75%[121-123]。有趣的是，虽然肠道病毒是无菌性脑膜炎最主要的致病病原体，但核酸扩增检测脑脊液肠道病毒的敏感性范围为70%～100%[121,124-127]。造成这一偏差的部分原因是在美国约5%的新生儿败血症和无菌性脑膜炎的致病病原体是副肠孤病毒，但它不能被一般的肠道病毒逆转录-PCR方法所检出[9]。

有限的研究评估了核酸扩增检测其他类型标本的敏感性和特异性。对于血清标本的肠道病毒诊断，其敏感性和特异性分别为81%～92%和98%～100%[122,128]。对于脑脊液、咽拭子或粪便标本的肠道病毒和副肠孤病毒的检测，逆转录-PCR比分离培养方法的敏感性高100～1000倍[94,129-130]。核酸扩增检测除了敏感性高外，还具有检测周期短的优点，包括病毒核酸提取在内只需2.5 h即可出检测结果[131]。

在进行核酸扩增检测前，需要先从标本中提取肠道病毒RNA以消除RNA酶和潜在的扩增抑制剂的影响。通常仅需要100～350 μl的液体标本或1 mg的组织标本即可进行肠道病毒RNA提取。最常用的RNA提取方法是凝胶膜或磁性二氧化硅吸附法。多种全自动RNA提取仪器已在临床应用，包括MagNA Pure LC and Compact（罗氏诊断系统），easyMAG（bioMérieux）及M48、QIAcube、EZ One和QIAsymphony（Qiagen）。GeneXpert系统可以在一个反应槽中完成肠道病毒RNA提取、扩增和检测[131]。核酸扩增检测从核酸提取到检测的所有过程在本书第7章中有详细介绍。

目前有两款脑脊液肠道病毒检测试剂盒通过了美国FDA的认证，分别是Xpert EV和BioFire公司的脑膜炎/脑炎模块（表90-4）。在一项多中心分析中，Xpert EV的敏感性达到95%，特异性达到了100%[132]。然而，在日常临床检测中敏感性会明显低于该值[133]。BioFire公司的脑膜炎/脑炎模块为多重检测系统涵盖与脑膜炎/脑炎相关的7种病毒（包括肠道病毒、副肠孤病毒）、6种细菌及1种酵母菌检测，该检测系统对于肠道病毒和副肠孤病毒检测的敏感性分别为95.7%和100%[134]。然而，为了更好地评价这一检测模块的性能，仍需要肠道病毒和副肠孤病毒阳性标本的大样本量研究及与Xpert EV检测头对头比较的研究[135]。

表 90-4 肠道病毒和副肠孤病毒的核酸扩增检测方法

产品名称(厂家)	方法	目的片段	监管状态	说明	文献
Xpert EV (Cepheid)	实时 RT-PCR	5'NTR	IVD[a]	在一个反应槽中完成病毒核酸提取、扩增和检测	131-132
Enterovirus R-gene (bioMérieux)	实时 RT-PCR	5'NTR	CE-IVD[b]	使用多重提取和实时定量 PCR 平台	149
MGB Alert Enterovirus (ELITech)	实时 RT-PCR	5'NTR	ASR[c]	使用专利性化学方法	
MultiCode Enterovirus Primers (Luminex Corporation)	实时 RT-PCR	5'NTR	ASR	使用标记引物和专利性化学方法	
Artus Enterovirus (Qiagen)	实时 RT-PCR	5'NTR	RUO[d]		
EV noncommercial reagents	实时 RT-PCR& 传统 RT-PCR	5'NTR, VP2	LDT[e]		127, 138-139, 148
Parechovirus R-gene (bioMérieux)	实时 RT-PCR	5'NTR	CE-IVD	使用多重提取和实时定量 PCR 平台	161
HPeV noncommercial reagents	实时 RT-PCR	5'NTR	LDT	检测 HPeV 1-16	154-157
Meningitis/Encephalitis (ME) Panel (BioFire)	实时 RT-PCR	5'NTR	LVD	在一个体系中完成 EV、HPeV 和其他病原体病毒核酸提取、扩增和检测	134
FTD Viral Meningitis (Fast Track Diagnostics)	多重实时 RT-PCR	5'NTR	CE-IVD	EV 和 PeV 的多重检测	162
EV & HPeV Multiplex noncommercial reagents	多重实时 RT-PCR	5'NTR	LDT	EV 和 PeV 的多重检测	158-159

注:[a]IVD. invitro diagnostic(FDA-approvedtest),体外诊断(FDA 认证的检测方法);[b]CE-IVD. Conformité Europêene,通过欧洲一致性认证的体外诊断;[c]ASR. analyte-specific reagent,分析物特异性试剂;[d]RUO. 仅限用于科研;[e]LDT. laboratory-developed test,实验室自建检测;[f]IC. 内部质控(译者注:原表中无 f)

此外,已经有多种包含肠道病毒和(或)鼻病毒的多重呼吸道病毒检测项目可供选择。在美国主要包括 Luminex 公司研发的 xTAG 呼吸道病毒模块(xTAG Respiratory Viral Panel)、xTAG 呼吸道病毒快速检测模块(xTAG Respiratory Viral Panel FAST)及 VERIGENE 呼吸道感染检测(VERIGENE Respiratory Tract Infection Test);BioFire Diagnostics 公司研发的 FilmArray 呼吸道模块(FilmArray Respiratory Panel)、呼吸道模块 EZ(Respiratory Panel EZ)及呼吸道模块 2(Respiratory Panel2);GenMark 诊断公司研发的呼吸道病原体模块 ePlex(ePlex Respiratory Pathogen Panel)。这些检测模块已通过美国 FDA 认证,并适用于鼻咽标本,其并不能很好地区分肠道病毒和鼻病毒。这些分析中肠道病毒/鼻病毒检测成分的直接比较数据尚不充分,关于检测目标的整体敏感性和特异性的比较显示各有差异[136-137]。

采用分析物特异性试剂(analyte-specific reagents,ASRs)、实验室自建检测(laboratory-developed tests,LDTs)和已获得欧盟 CE-IVD 认证的肠道病毒实时定量 RT-PCR 检测方法应用广泛(表 90-4)。LDT 的常规靶向保守序列是肠道病毒 5' NTR 或 VP2 基因,这是肠道病毒 PCR 检测的通用扩增区(表 90-4),最常用的扩增目的片段是 5' NTR,见于 Rotbart[138] 和 Chapman[139] 等的报道。然而 ASR 和 LDT 的检测引物不能检测副肠孤病毒(下文讨论),但可检测部分鼻病毒[140-142],同时也会漏检部分肠道病毒株[143]。对于所有 ASR 和 LDT 检测方法,实验室在必须对这些检测方法进行开发和验证。

虽然实时荧光定量 PCR 的便利性和优越性在增强,但在病毒分型方面常规的逆转录-PCR 仍是主导方法[144-145]。常规 PCR 方法有一系列的检测系统,包括琼脂糖凝胶电泳、逆转录环介导等温扩增(reverse transcription loop-mediated isothermal amplification, RT-LAMP)[146-147] 和采用酶联免疫吸附方式的比色测定[127,148-149]。

在质量控制方面,肠道病毒核酸扩增检测应

设置内部质控，以对核酸提取过程进行评估和对扩增中是否存在抑制剂进行检测。肠道病毒RNA检测的验证实验和质量保证操作证明肠道病毒检测需要有通用和规范性标准，但目前还未建立。目前，绝大多数实验室使用的是定量的肠道病毒分离株或目的片段克隆的转录本，这2种方式都是实验室自创和验证的。还有另一种可选方式，即商品化来源肠道病毒和副肠孤病毒作为确认和质控品，但这些病毒并未进行定量。

LDT肠道病毒核酸扩增检测的多中心能力验证显示，不管采用何种形式，只要设计恰当，都能达到近似的检测效果[150]。有研究报道在不同中心之间存在能力差异。在一项调查报告中，1/3的参比实验室不具备开展肠道病毒逆转录-PCR检测的能力[112]。在另一项调查研究中，有6.8%的参比实验室的检测结果为假阳性，这显示在检测过程中防止交叉污染是极其重要的工作[150]。总之，这些比对研究表明严格的质量控制和周期性的能力评估对于保证稳定和高质量的检测结果是十分重要的。

目前已有关于副肠孤病毒逆转录-PCR检测方法的详细报道[13,141,151]。虽然最早的方法仅能检测副肠孤病毒1型和(或)2型[151-153]，但近期已有报道至少可以检测副肠孤病毒1～6型的方法(表90-4)[154-157]，有些方法甚至可以检测副肠孤病毒全部19个型[156]。截止到目前为止，美国仅有一项FDA批准的副肠孤病毒检测——BioFire公司的ME模块，所以使用LDT方式进行副肠孤病毒PCR靶向检测及肠道病毒和副肠孤病毒双重PCR靶向检测常见[158-160]。在欧洲，2项副肠孤病毒检测已经通过欧盟CE-IVD认证：生物梅里埃公司的副肠孤病毒r-Gene检测和Fast Track Diagnostics公司的食源性病毒性脑膜炎快速诊断检测[161-162]，后者是一种多重逆转录-PCR分析并可以同时检测肠道病毒和副肠孤病毒(表90-4)。

七、病毒分离程序

由于没有某种单一细胞系对所有肠道病毒和副肠孤病毒都敏感，故将来自于人的细胞系和灵长类动物的细胞系混合培养后，更适用于肠道病毒和副肠孤病毒的分离培养。此外，柯萨奇病毒A(CVA)部分血清型在细胞培养中不能生长[1]。这些常用细胞系的一般敏感性见表90-5。采用传统的细胞培养方法从脑脊液标本中分离肠道病毒需耗时4～8天，当从肠道病毒滴度较高的部位采集标本进行细胞分离时，耗时可缩短为1～3天。副肠孤病毒细胞培养所耗费的时间不固定，取决于病毒和细胞的种类，并经常与延迟或无细胞病变效应(cytopathic effect，CPE)产生有关[163]。

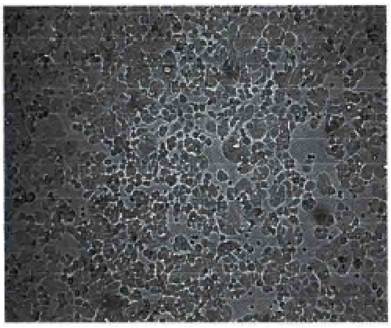
表90-5 通常用于分离肠道病毒和副肠孤病毒的细胞系的敏感性

细胞系	对病毒的敏感性[a]									
	脊髓灰质炎病毒	柯萨奇病毒		埃可病毒	副肠孤病毒					
		A[b]	B		1	2	3	4	5	6
主要为猴源性(猴肾细胞)										
原代恒河猴肾细(pRh-MK)	+++	+	+++	+++	+	+	未知	未知	未知	未知
原代短尾猴肾细胞(pCMK)	++++	+	+++	+++	+	+	未知	未知	未知	未知
水牛绿猴肾细胞(BG-MK)	+++	+	++++	++	+++	−	++	−	−	−
非洲绿猴肾细胞(Vero)	+++	+	+++	++	++++	+	++++[c,d]	++	++	++[d]
恒河猴肾细胞(LLC-MK2)	+++	+	+++	+++	+++	+++	++[d]	−	−	−
短尾猴肾细胞(tMK)	+++	+	+++	+++	++	++	+	++	+	−
人源性										
人子宫颈腺癌细胞(HeLa)	+++	+	+++	+	++	+	−	+	未知	未知

（续　表）

细胞系	对病毒的敏感性[a]									
	脊髓灰质炎病毒	柯萨奇病毒		埃可病毒	副肠孤病毒					
		A[b]	B		1	2	3	4	5	6
人结肠癌细胞(HT-29)	+++	+	+++	+++	+++	+++	−	+++	+++	+
人结肠癌细胞(CaCo-2)	+++	+	+++	+++	++[d]	±[e]	+[d]	++[e]	−	−
人胚肺成纤维细胞(HEL)	+++	++	+	+++	−	−	−	−	−	−
人胚肺成纤维细胞(MRC-5)	+++	+	+	+++	+	+	−	未知	未知	未知
人胚肺成纤维细胞(WI-38)	++	++	+	+++	+	+	−	未知	未知	未知
人表皮样癌细胞(HEp-2)	+++	+	+++	+	++	++	−	未知	未知	未知
人肾上皮细胞(293)	+++	+	++	+++	++	++	−	未知	未知	未知
人肺癌细胞(A549)	+++	+	+++	+++	++	++	−	++	++	−/+
人横纹肌肉瘤细胞(RD)	+++	+++[f]	+	+++	+++[d]	±[d]	+++[d]	+++[d]	++[d]	++[d]
鼠源性										
L20B 细胞[g]	++++	+	−	−	−	−	未知	未知	未知	未知
超级混合细胞 E(BGMK-hDAF[h] 和 CaCo2 混合细胞)	++	++	++++	++++	++	++	未知	未知	未知	未知

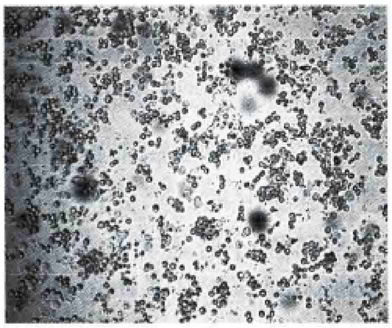
注："+"表示敏感性最低，"++++"表示敏感性最高，"−"表示不敏感，"未知"表示没有相关数据报道。部分肠道病毒在敏感性最低的细胞系中也难以被分离到。[b] 部分 A 组柯萨奇病毒(A1、A19 和 A20)不容易被分离到。[c] 传代后产量提高。[d] CPE 延迟。[e] 无 CPE。[f] 许多 A 组柯萨奇病毒只能在 RD 细胞中繁殖。[g] L20B 细胞系；构建得到的带 PV 受体的 L 细胞系，CD155。[h] BGMK-hDAF，表达人衰变加速因子的 BGMK 细胞



未感染病毒的 HT-29 细胞



感染肠道病毒的 HT-29 细胞



感染副肠孤病毒 1 型的 HT-29 细胞

图 90-3　HT-29 细胞感染肠道病毒或副肠孤病毒 1 型 3 天后的细胞病变效应
注：图片来自参考文献[165]

肠道病毒感染单层敏感性细胞后会出现特征性的 CPE，表现为单层细胞内的单个细胞皱缩变圆及细胞核固缩。随着感染进程，细胞会从单层细胞内解离脱落。CPE 通常是特征性的(图 90-3)，可据此作出肠道病毒感染的初步诊断。然而这也需要经验，因为原始标本中的毒素，如艰难梭菌毒素也会使细胞出现类似 CPE 现象[164]。虽然肠道病毒和副肠孤病毒引起的 CPE 非常类似，但还是存在差异，副肠孤病毒导致的 CPE 可以出现面积大且形状更规则的球体，而肠道病毒引起的

CPE 面积小且形状不规则(图 90-3)[165]。

脑脊液病毒培养的敏感性相对较低(65%~75%[166]),这很可能与脑脊液中存在中和抗体、用于全面培养的脑脊液标本体积不足(如要接种 3~5 种细胞系时)、低病毒载量和部分血清型病毒对细胞培养存在抗性有关。特别是肠道病毒 C 组中许多血清型(如 CVA1、CVA19 和 CVA22)和副肠孤病毒 7~14 型不可通过细胞培养进行病毒分离。以前认为粪便标本培养的敏感性要高于脑脊液标本[167],但是,粪便进行 PCR 检测敏感性甚至更高[130]。

壳瓶培养(shell vial culture,SVC)是在无 CPE 出现的情况下,应用单克隆抗体对病毒进行检测,可将检测时间缩短为 2~3 天,壳瓶培养的敏感性高于或不高于传统细胞培养[168-170],其敏感性的高低取决于实验室的能力和细胞系类型[171]。壳瓶培养法的单个壳瓶培养管中有多种细胞系混合生长(如 Diagnostic Hybrids 公司生产的含表达衰变加速因子的 BGMK 细胞和 A549 细胞的 Super E-Mix),这可提高壳瓶培养的检测敏感性[170-171]。Super E-Mix 壳瓶培养管是否可用于分离副肠孤病毒尚无研究,但可预测它至少可用于副肠孤病毒 1 型和 2 型的检测,是因为其中含有的 A549 细胞是副肠孤病毒 1 型和 2 型的敏感细胞系。壳瓶培养最大的限制因素是检测阶段单克隆抗体的使用(下文会讨论)。

八、鉴定

广泛反应性和肠道病毒血清型特异性的单克隆抗体已被研发出来[172],并应用于免疫荧光检测法鉴定病毒细胞分离培养物。初步研究显示,这些单克隆抗体单个或混合使用时(如 DAKO 公司的 DAKO-Enterovirus 5-D8/1 抗体和 Chemicon International 公司的 Pan-Enterovirus 混合物),对肠道病毒血清型别的鉴定有重要作用,但进一步研究显示其也有局限性[168-169,173]。最显著的缺陷是 Chemicon 公司混合抗体出现交叉反应[168],Dako 公司混合抗体无法检测 EV71。肠道病毒混合抗体已被研发出来(Diagnostic Hybrids 公司的 D3IFA Enterovirus Identification),报道称其敏感性,能检测 EV71 且没有或很少有交叉反应性。采用混合性单克隆抗体和中和试验对肠道病毒临床分离株进行鉴定的一致性研究发现,中和试验检测明显优于混合性单克隆抗体检测[173]。这些研究显示单克隆抗体更适合于肠道病毒种别和血清型别的初筛鉴定。对于副肠孤病毒,仅有针对 1 型和 2 型的分型试剂可用,且并不是所有副肠孤病毒 2 型均可被特异性抗血清中和[174]。

九、分型系统

通过核苷酸突变和基因组重组的病毒科具有很强的遗传变异性[175-176]。但由于肠道病毒感染引起的疾病是非血清型特异性的,故临床诊治通常不需要确定病毒的血清型别。目前,肠道病毒型别的鉴定主要应用于疫苗衍生脊髓灰质炎病毒和非脊髓灰质炎肠道病毒的区分,这有助于在接种 Sabin 脊髓灰质炎病毒疫苗株的地区鉴定标本分离株,疫苗株在接种后能从咽部持续分泌 1~2 周,且能在粪便中存留数周至数月[32]。对非脊髓灰质炎肠道病毒的血清型进行鉴定有助于病毒的流行病学研究,且可确定罕见的或新的临床症状(如弛缓性麻痹)是否与病毒血清型相关[1-2]。

原先是用 Lim Benyesh-Melnick(LBM)抗血清库做中和试验对肠道病毒血清型进行分型,但肠道病毒长期累积的遗传漂移变会导致抗原变异。中和试验操作过程需要较大的工作量,而且由世界卫生组织提供的 LBM 抗血清库数量有限(仅分发给参比实验室)。

*VP*1 基因序列分析是病毒分型的主要方法。*VP*1 基因中长 340 bp 的血清型特异性中和表位编码区经 PCR 扩增和测序后,通过将核苷酸序列与已知的肠道病毒数据库比对而确定病毒型别[145,177]。*VP*1 完整基因序列中 25%的核苷酸差异和 12%的氨基酸差异阈值是以前肠道病毒血清型划分时判定是否为同一血清型的标准[5]。Nix 等[145]研究报道的基于测序分型的焦磷酸测序法可减少肠道病毒分型时间[178]。分子分型方法与传统血清分型方法相比,检测时间缩短了数周[177]。此外,对于鉴定新的肠道病毒血清型及对无法应用传统的 LBM 抗血清库进行中和试验的"未分型"分离株时,分子分型方法就极为有用[5]。

还有多种分子方法用于种特异性分型(如脊髓灰质炎病毒)或多种肠道病毒型别的鉴定。分型特异性实时定量分析已应用于近年来 EV-

D68[179-181]、EV-A71、CV-A6、CV-A16[182]和脊髓灰质炎病毒[183]暴发中。在开发与诊断领域，RNA 等温扩增分析已被研发用于 CV-A6、CV-A16、EV-A71 和 CV-B3 的分型。RNA 等温扩增分析主要包括同步扩增检测(simultaneous amplification and testing, SAT)[184]，等温多自配引发扩增技术(reverse transcription-isothermal multiple-self-matching-initiated amplification, RT-IMSA)[185]及一步法逆转录环介导等温扩增(reverse transcription loop-mediated isothermal amplification, RT-LAMP)[186-190]。

由于副肠孤病毒尚缺乏用于血清分型的抗体，并且其中一些型别不能在细胞培养中生长，因此已开发了类似于肠道病毒 VP1 的"分子血清分型"。这些方法已经成为副肠孤病毒的标准分型方法，并发现了多种新型的副肠孤病毒。

十、血清学试验

在临床实践中，有可能会出现要求患者进行肠道病毒血清学检查的情况，比如对于心肌炎患者和先天性感染的孕妇。然而，已经证明这些患者的肠道病毒血清学试验几乎没有临床应用价值[191]。可以从美国的一些商业实验室获取补体结合试验检测产品，但由于补体结合试验缺乏特异性，一般不被作为肠道病毒感染的诊断依据[32]。肠道病毒感染经典的血清学试验方法是采用中和试验，比较急性期和恢复期血清中特异性抗体滴度，如果有 4 倍以上的升高就诊断为新近感染。但由于肠道病毒感染在早期无特异性临床表现，故急性期血清通常难以获取。

型特异性 ELISA 方法可以检测肠道病毒血清特异性 IgM 抗体(如 CVB 特异性 IgM 和 EV71 特异性 IgM)，可检测肠道病毒特异性 IgA、IgM 和 IgG 的异型试验(heterotypic assays)也已经研发出来[192-193]。同型试验(homotypic assays)由于其敏感性低于 PCR 而较少用于肠道病毒临床诊断，更多地用于肠道病毒的流行病学研究[2,194]。再者，由于肠道病毒反应性 IgM 可以是非特异性的，故会导致假阳性结果[195-196]。尽管与非肠道病毒病原体产生交叉反应的机制还未完全研究清楚，有报道当应用肠道病毒 IgM 抗体进行 ELISA 检测时，急性甲型肝炎病毒(小 RNA 病毒科成员)感染患者的血清会产生相当数量的肠道病毒 IgM 假阳性结果[193]。

目前尚无用于副肠孤病毒血清学试验的商品化试剂盒，因此，检测仅限于流行病学研究。此外，研究试剂也不能进行副肠孤病毒分型[24]。

十一、抗病毒药物敏感性

目前，还没有美国 FDA 认证的治疗肠道病毒或副肠孤病毒感染的抗病毒药，但有多种针对病毒衣壳蛋白、蛋白酶、聚合酶和其他病毒蛋白的药物正处于研发阶段，其中一些药物已处于Ⅲ期临床试验阶段[197]。被称为"WIN"化合物的普拉康纳利(pleconaril)是一种具有应用前景的临床试验药物，已完成针对肠道病毒的体外敏感性实验和临床试验，但尚未获得美国 FDA 的使用许可[198-199]。还有一种具有抗脊髓灰质炎病毒活性的药物——pocapavir 正处于评估阶段并已经用于在以同情使用(compassionate-use)为基础的治疗处理中[200-202]。

十二、结果的评价、解释和报告

了解病毒无症状排毒和诱发疾病的病毒复制所发生的部位，对于肠道病毒和副肠孤病毒检测结果的解释非常重要。如果从患者中枢神经系统、血流、下呼吸道和泌尿生殖道中检出病毒，提示确实有侵入性感染并与当前疾病高度相关。相反，由于病毒可从鼻咽和胃肠道无症状且持续数周至数月排出，故从这些部位采集标本进行病毒分离和核酸扩增检测时，如果仅检出肠道病毒就要对检测结果谨慎解释，因为在这些部位仅有肠道病毒单独存在并不足以支持其与当前疾病相关。从脑膜炎患者的粪便或者鼻咽部位检出肠道病毒可能是患者在数周前感染肠道病毒且已经痊愈后残存的病毒排毒，故可能与目前疾病没有相关性。

在婴幼儿中，另一个会影响检测结果判断的干扰因素是他们在出生后的第 1 年会口服脊髓灰质炎减毒活疫苗。虽然这种疫苗在美国已被停止使用[32]，但全球大多数国家包括欧洲部分国家仍将这种口服脊髓灰质炎减毒株疫苗列为疫苗制度的一部分。在这种情况下有必要区分是脊髓灰质

炎病毒还是非脊髓灰质炎肠道病毒。

另外一个呼吸道标本关于核酸扩增检测特异性的问题为肠道病毒检测很可能与鼻病毒存在交叉反应。很多商业化检测并未说明区分两者。此外，大部分检测并没有完成肠道病毒或鼻病毒的大样本量评估来确认其对所有菌株的包含性与排除性[203]。然后，临床上很少需要区分不同的病毒尤其是呼吸道感染。需要注意的是，鼻病毒属于肠道病毒。仅极少数情况是需要区分的，并且需要进行分型。即便是病毒性心内膜炎，了解病原体的学术价值也是高于治疗益处的。

还有一个更加值得注意的问题是中枢神经系统的肠道病毒和细菌混合感染[142]。在这种罕见病例中，疾病症状与细菌性脑膜炎类似，后期偶然分离到肠道病毒。由于疾病严重，无论是否检测到病原体核酸序列都应使用抗微生物药物治疗。当患者的症状是典型的病毒性脑炎时，发生无症状细菌混合感染的可能性极小。因此，从患者无菌部位检出肠道病毒且与临床症状相符时，可以做出肠道病毒是致病病原的结论。当出现肠道病毒感染相关的临床症状，但肠道病毒检测是阴性时，应考虑进行副肠孤病毒核酸扩增检测。

参考文献请扫二维码查阅

第91章 鼻病毒

MARIE LOUISE LANDRY, XIAOYAN LU

（袁星燎、曲久鑫 译；崔仑标 审校）

一、分类

人鼻病毒（human rhinoviruses，HRVs）属于小RNA病毒科。人鼻病毒以前曾作为一个独立的属，现在已重新分类到肠道病毒属，分为3个种（A、B、C）[1]。其他对人类有致病性的小RNA病毒科成员包括跟呼吸道疾病相关的副肠孤病毒属（*Parechovirus*）和肝病毒属（*Hepatovirus*）。最近发现心病毒属（*Cardiovirus*）也包含人类致病原[2]。

鼻病毒的命名源于它的病毒复制位置和症状发生的部位主要在鼻部。根据型别特异抗血清的中和反应，最初将鼻病毒分成99个血清型（RV1～RV99）。后来通过测序研究显示，事实上鼻病毒中很多型别无法培养，也无法进行血清型分类（见下文）。尽管存在部分交叉中和反应，但是鼻病毒不存在群抗原[3-4]。根据序列相似度，可以将鼻病毒血清型进一步分类成RV-A和RV-B两种，RV-A包括74个血清型，RV-B包括25个血清型。在20世纪六七十年代，最初分离出来的99株鼻病毒原型株已经在美国典型培养物保藏中心（ATCC）繁殖并保存了下来。其中鼻病毒血清型87型通过测序分析显示为对酸敏感的肠道病毒（enterovirus，EV）D-68型[5-6]。

根据结合受体，可以将鼻病毒的血清型分为2个群[7-8]：①主要群（63个RV-A血清型和25个RV-B血清型）结合于细胞黏附分子（ICAM-1），ICAM-1是免疫球蛋白超基因家族的成员之一，可以在许多不同细胞表面表达[9]；②次要群（11个RV-A血清型）结合于低密度脂蛋白家族成员[8]。

随着分子生物学方法在病毒诊断方面的广泛应用，在下呼吸道感染的患者中发现了一群新的鼻病毒[10]。这群鼻病毒归类为新的C群，但这群病毒并非新出现的[11]，而是由于在标准的鼻病毒细胞分离培养体系中未生长而被忽视。最近，RV-C病毒的体外培养在人鼻窦上皮细胞培养和分化的气道上皮细胞的气液界面培养中得以实现[13-14]。最近的研究发现，RV-C病毒可以利用钙黏蛋白相关家族成员受体3（cadherin-related family member 3 recepor，CDHR3）进入宿主细胞[15]。CDHR3是一种存在于人肺组织、支气管上皮细胞和培养的气道上皮细胞的跨膜蛋白。有趣的是，CDHR3的单核苷酸多态性（rs696730，p.Cys529Tyr）可增强与RV-C的结合效率、增加病毒复制，这表明Cys529Tyr变异体可能是RV-C相关的儿童喘息和哮喘住院的一个危险因素[16]。

对99株RV-A、RV-B血清型及已知的RV-C进行全基因测序，证实所有病毒株分为3个不同的系统发育组[17]。由于RV-C对细胞培养不敏感，因此无法进行血清分型，故建立了基于遗传的RV基因型分类系统，同时保留了血清分型系统[18]。迄今为止，基于“与RV原型株VP1编码区核苷酸差异≥13%”为标准已经对55个RV-C基因型进行了分型，如果VP1编码区不能分型，可以用VP4/VP2编码区10%的核苷酸差异进行分型；此外，可以用VP1编码区≥13%和12%的核苷酸差异分别用于RV-A和RV-B的基因型分型[19]。使用上述标准，基因型A44、A95和A98已经废除并分别合并到A29、A8和A54[19]。加上新近发现的9个RV-A和6个RV-B基因型，目前为止发现的RV型别总数已达166种。

二、病原体的描述

RV的基因组为单股正链RNA，长约7200个核苷酸，基因组结构由一个5′非编码区（5′UTR）加上一个短肽（VPg）组成，这个短肽可作为基因组复制的引物[20]，之后是一个可读框，由3′多聚（A）末端终止（图91-1）。5′UTR内的二级结构包括三叶草形结构域和一个内部核糖体进入位点，这对于翻译蛋白是必要的。这个可读框的单个多肽产物随后被蛋白水解成11种病毒蛋白（图91-1）：4种结构蛋白质构成病毒衣壳（1A～1D或VP4～VP1），7种非结构蛋白质参与病毒复制或多蛋白加工（2A～2C和3A～3D）。3C蛋白酶参与多肽的裂解，同时也是抗病毒药物的靶点。

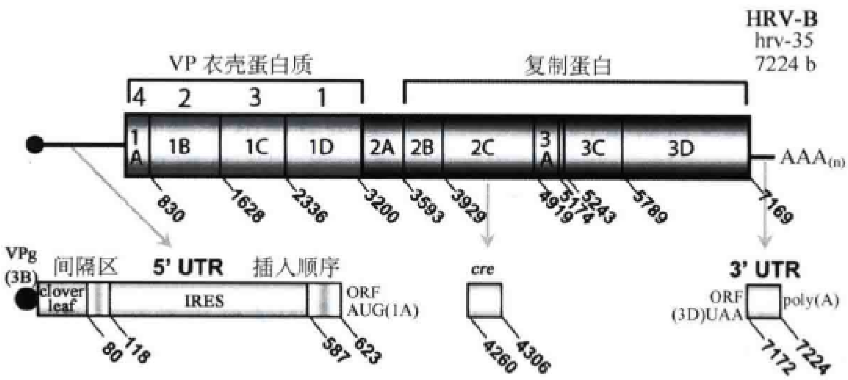


图91-1 鼻病毒基因结构。鼻病毒基因组包括一个可读框，5′和3′端为非编码区（UTR）。VPg. 一个小病毒蛋白，通过共价键和5′端非编码区相连。VP. 病毒蛋白；clover leaf. 三叶草形结构区域。IRES. 内部核糖体进入位点；cre. 顺式作用复制因子。转载自参考文献[26]，见彩插

RV病毒颗粒较小，直径为20～27 nm，为无包膜的二十面体结构，包含60个原体单位，每个均含4个结构蛋白亚基（VP1～VP4）。VP1、VP2和VP3位于病毒颗粒的外部，构成病毒颗粒的蛋白外壳。VP1是病毒衣壳中最大、最外层的免疫原性蛋白[21]。一些主要的中和位点位于VP1蛋白。位于VP1蛋白的疏水区是抗病毒药物的结合部位，如普利康那利[22]。VP4存在于蛋白衣壳内。X射线晶体和冷冻蚀刻电子显微镜研究表明在60个原体单位上有很大的凹痕或成峡谷状，它们是细胞受体结合位点，在吸附后的构象改变上起到至关重要的作用[23]。一些抗病毒药物能够使峡谷的构象发生改变，从而抑制病毒吸附细胞或病毒的脱衣壳[22]。

鼻病毒在被感染的细胞的细胞质中进行复制，产生感染性病毒颗粒，这些病毒颗粒的在氯化铯中的浮力密度为1.4 g/L。在复制过程中也会产生一些空的病毒衣壳和缺少一个或多个结构多肽的有缺陷病毒颗粒。

突变和重组是驱动RVs广泛遗传多样性的两种机制，是RV进化的基础。RNA依赖性3D RNA聚合酶促进新的病毒基因组的合成，因为其无校正能力，经常会发生突变。RV-A和RV-C在5′UTR重组的证据表明：在系统发育分析中，一些RV-C基因型的5′UTR序列聚类于RV-A分支[24-25]。虽然RV-B和RV-C在基因组编码区域内重组的证据很少，但最近的研究表明，RV-A序列在分化成不同型别的早期阶段经历了广泛的种内重组，目前几个RV-A毒株由此形成[26-27]。

由于无脂质膜，RVs对乙醚、氯仿、乙醇和5%的苯等有机溶剂的失活有较强的抵抗力。虽然RVs相对来说是对热稳定的，但是在加热到50～56℃的温度后，感染性会逐渐降低。和肠道病毒不同，鼻病毒暴露在pH 3的室温环境下超过3 h就会丧失感染性，尽管不是所有血清型和毒株都是这样。

三、流行病学和传播

RV感染广泛传播，一年四季均可发生。随着分子检测方法的应用，发现了在夏季和冬季出现大量的鼻病毒感染[28-30]，在温带地区的传播高峰期是秋季和晚春[28]。

较高的室内相对湿度，以及秋季开学后孩子们的聚集状态，使得 RV 的生存率提高，进而引起鼻病毒感染的季节波动性[31]。RV-A 和 RV-B 可以同时或者交替流行[32-34]，但是，RV-B 一般较少被检测出来[34]。随着鼻病毒感染的疾病负担和多样性变得明显，人们开始重视鼻病毒基因分型、分子流行病学，以及基因型与毒力的相关性研究[11]。

对志愿者的研究表明，虽然鼻病毒可以通过气溶胶传播，但引发感染最高效的途径是将病毒接种到鼻子和结膜[35-36]。感染者的鼻腔中的鼻病毒滴度最高，常常会污染他们的手和周围的环境。因此，研究人员发现鼻病毒可以通过手-手接触传播[37]，或污染物传播，然后将病毒自体接种到鼻子或结膜[38]。此外，使用浸有消毒剂的纸巾擤鼻子、表面环境消毒处理及应用碘消毒手指可阻断病毒传播[39]。最近研究显示含酒精的洗手液较肥皂和清水洗手更有效，添加有机酸可以增强和延长洗手液的消毒活性[40]。然而，在自然环境下减少病毒的传播还无法实现。

鼻病毒主要在气道上皮细胞细胞内复制，也可以在中耳和鼻窦中复制，潜伏期为 1～4 天[41]，病毒的排出高峰期与急性鼻炎一致。鼻病毒感染的典型症状包括流鼻涕、鼻塞、打喷嚏、头痛、轻微的喉咙痛、咳嗽、低热或者不发热，症状平均持续 7 天，但可以持续 12～14 天甚至更长时间[42-43]。4～5 天时病毒就可能培养不出来了，或者低滴度持续 2～3 周时间[44]。无症状 RV 感染也很常见，在感染者中占 20%～30%[28,45-47]。一些研究者使用逆转录聚合酶链反应（reverse transcription-PCR，RT-PCR）在症状出现 4～5 周后仍可检测出 RV RNA，令人惊讶的是，在症状出现前 2～3 周即可检出[46,48]。然而，基因分型显示持续的病毒排出是一系列不同型别的鼻病毒陆续感染所致，其中一些是无症状感染[49]。已发现 74 种不同鼻病毒型别流行，包括同一种属多种型别[49-50]。只在免疫力低下者中发现了单一型别的鼻病毒慢性排出[51]。

RV 感染的临床症状会随着炎症反应化学介质水平起落而变化[38-39]。心理压力大和睡眠不足似乎会增加病毒易感性和临床症状的发展[52-54]。早期研究结论认为，鼻病毒免疫具有型别特异性，与局部分泌型 IgA 密切相关[55-56]。

四、临床表现

约 2/3 的上呼吸道感染是由鼻病毒引起，症状表现为普通感冒，相比于其他感染性病原可导致更多的疾病发作[28,39]。在美国，尽管普通感冒是微不足道的疾病，但它可导致劳动力暂时丧失，每年因感冒所致工作日减少及感冒药和镇痛药等治疗费用造成的损失约 400 亿美元[57]。

随着分子诊断方法的应用，发现了越来越多的鼻病毒重症感染病例，鼻病毒可以单独引起鼻窦炎或中耳炎，同时也可以促进继发细菌感染[58-60]。鼻病毒被认为是与哮喘发作、肺囊性纤维化及慢性阻塞性肺疾病有关的主要病毒性致病因子[61-64]。对于遗传易感的儿童，婴儿时期鼻病毒引起的哮喘与儿童时期的哮喘发作确实相关[65-66]。这种疾病对于老年人的影响也是巨大的。在加拿大的一项研究中显示，在长期护理机构，59%的呼吸系统疾病的暴发都是由鼻病毒引起的，也包括一些严重病例[67]。

对于那些有哮喘或肺炎的住院患者[70-73]，包括学龄期儿童[74]、老年人[31,75]，还有本身有慢性疾病、癌症、免疫功能低下、器官移植[76-82]或潜在的肺部疾病患者[64,83]，鼻病毒越来越多地在下呼吸道感染患者中检测出来[68-69]。对于住院婴幼儿，鼻病毒感染的临床表现和呼吸道合胞病毒感染很相似，但患儿的平均年龄会偏大一些[72]。鼻病毒既可以单独感染，也可以合并其他病毒混合感染。它已经被证明可以削弱先天免疫应答反应[84-85]，导致儿童易患侵袭性肺炎链球菌感染，在慢性阻塞性肺疾病（COPD）患者中易引起细菌二次感染[60,85-87]。

一些研究表明，RV-C 是引起发热、气喘、下呼吸道疾病住院患者的主要鼻病毒种，尤其是婴幼儿和哮喘儿童[32,88-93]。与传统的 RV-A 和 RV-B 相比，RV-C 在 37℃ 或 34℃ 的温度下都可以达到同水平的复制，并以促进下呼吸道感染的发生[10]。CDHR3 作为 EV-C 的受体，已被证实为哮喘发作的易感位点[16]。然而，在得出关于鼻病毒种属患病率及毒力的肯定结论前应开展进一步的人群研究[41]。

虽然鼻病毒血症很少能通过培养证实，但使用敏感的分子诊断方法可以在鼻病毒感染的重症

呼吸道疾病幼儿的血液中检测出 RV RNA[14,94]（其中 25%的病例是与鼻病毒相关的哮喘发作患儿[47]，主要相关的病毒种是 RV-C[14,94]）。在患有脑膜炎、心包炎、肠胃炎，甚至健康的儿童的粪便标本中也可以检测出鼻病毒[95-98]。

由于 RV 在历史上一直难以培养和血清分型，所以关于血清型、临床表现和毒力之间相互关系的信息很少[99]。不过随着基因分型技术的发展及对鼻病毒感染造成的疾病负担的更加关注，这一领域的研究会越来越多[28,41,98]。

由于鼻病毒的种类众多，疫苗的前景一直以来被忽视。然而，最近多价灭活的鼻病毒疫苗在免疫小鼠和恒河猴身上取得了早期成功，意味着，疫苗对类型众多且具有多样性的鼻病毒产生广泛的免疫原性反应是可能的[100]。

五、标本的采集、运输和储存

自然感染情况下，感冒症状出现 1～6 天时可以分离到鼻病毒，但主要集中在发病的第 1 天和第 2 天病毒排毒达最高浓度。在上气道疾病中，由于从鼻腔中排出的鼻病毒滴度最高，用于分离病毒的标本应在鼻部采集，而不是采集咽部标本。

与鼻拭子、咽喉洗漱液和咽拭子相比，鼻腔洗液是分离鼻病毒最好的临床标本类型[56,101]。鼻腔洗液采集方法如下：患者头部后仰，向一侧鼻孔中注射 1 ml 无菌磷酸盐缓冲液，让患者前倾，将鼻孔内液体收集到无菌培养皿或其他容器中。重复操作，直到两侧鼻孔都用 5ml 磷酸盐缓冲液冲洗，将洗液转至一无菌容器中。然而，在大部分的临床工作中，鼻洗液标本不容易获得，而且也不是其他呼吸道病原的首选标本。

多年来，鼻咽抽吸物一直是采集婴幼儿样本的标准类型，但目前应用最方便且最广泛的样本类型是使用置于病毒转运液中的鼻咽拭子。采集良好的鼻咽拭子样本可以提供跟鼻咽抽吸物一样的检出率，而且更易获得[102-103]。最近研究发现，虽然鼻腔洗液比鼻咽拭子检出鼻病毒的阳性率更高，但使用植绒拭子时，数据上并无明显区别[104]。部分研究证实植绒拭子要优于棉拭子或其他类型的拭子。由于植绒拭子小、轴较软，对患者而言，比刚性轴、大且尖的采集拭子更舒适[104]。在一则报道中，中鼻甲拭子可以提供与鼻咽拭子相同的结果，它既适用于自我采集，也适用与父母为儿童采集[105-106]。据报道，对于呼吸道病毒来说，痰和鼻咽抽吸物在检出率上相当[107]。

为诊断下呼吸道感染，需要采集气管内抽吸物、支气管肺泡灌洗液（bronchoalveolar lavage，BAL）、支气管冲洗液和肺活检样本。最近发现，痰，包括儿童的诱导痰均可用于诊断下呼吸道疾病[103,108]。

所有样本应及时送往实验室。为获得最佳分离效果，应立即进行细胞培养；尽管在中性 pH 下，样本可以在病毒转运培养液中 4℃条件下保存 24 h。如果需要长时间保存，可以将标本冷冻至−70℃，接种前需解冻。冻存似乎不会对鼻病毒的复苏造成损害[101]。建议使用类似的样品处理方法进行分子检测；然而，在每个独立实验室，对于不同的病毒转运液与核酸提取试剂的相容性必须得到验证，所有商品化试剂盒都应遵循制造商的说明书。

六、直接检测

（一）抗原检测

由于鼻病毒有许多血清型，而又缺乏群抗原，故抗原检测方法并不应用于临床实践。

（二）核酸检测

1. 传统 RT-PCR 方法 分子诊断技术的广泛应用显著提高了鼻病毒的检出率，同时也加深了人们对于这些病毒在呼吸道疾病中作用的理解。研究证明，RT-PCR 方法比细胞培养更灵敏，检出率高 2～3 倍[45,109-112]，对于不可培养的 RV-C 病毒株，RT-PCR 有着明显的优势。然而，细胞培养可以检测出一些由于技术的差异性和因为引物或者探针不匹配而无法检测到的鼻病毒[110,112-113]。

Gama 等[114]在 1988 年首次报道了应用 RT-PCR 方法检测 RV，从那时开始，很多分子诊断技术被大家描述。这些方法一般是针对病毒基因的 5′非编码区，它包括高度保守序列，很适合分子诊断技术应用。然而，其中大部分技术也可以交叉检测肠道病毒，因为使用的引物不能有效鉴别这两种病毒。早期区分鼻病毒和肠道病的策略包括根据扩增子大小不同[115-116]，限制性内切酶消化相

同的扩增子[117]，内部探针杂交[113,118]，使用鼻病毒特异性引物进行巢式PCR[93]，或者使用对鼻病毒最优的退火、延伸时间等[111]。目前，大部分已报道的诊断技术都无法检测或明确区分所有病毒，也无法评估RVs和EVs的所有类型。RT-PCR和扩增子测序目前已被专业参考实验室广泛使用以区分RVs和EVs，并区分病毒类型，但仍难以常规应用于临床诊断[119]。

目前，分子生物学方法并无统一标准，已报道的这些方法在样本类型、RNA提取、引物选择、扩增和检测条件存在差异。使用3种已确认鼻病毒类型的阳性临床样本评价11对已报道的鼻病毒引物的相对敏感性，发现这些引物的检测能力不一致，尤其是在样本病毒载量很低时[120]。

2. 实时RT-PCR方法 使用SYBR Green、TaqMan水解探针或分子信标检测鼻病毒的实时RT-PCR技术已经建立[43,79,96,119,121-123]。由于实时荧光定量扩增试验的检测和扩增同时进行，所以它有着操作简单、降低扩增产物污染的风险、能够估算病毒载量和缩短检测时间等优点。虽然SYBR Green和熔解曲线分析比基于探针的方法成本低，但是获得的结果可能很难解读[43]。

最近改进的以5′UTR为靶基因的rRT-PCR方法[14,43]，可以检测所有公认的RV原型株，甚至是新发现的RV-C，它已经成功应用于不同人群感染RV的临床特征及流行病学的研究[32,73,124-126]。虽然已经进行了大量的努力去改善这项试验的特异性，但在临床样本的EVs病毒载量较高的时候，它仍然会和EVs发生交叉反应。

一些RV研究表明，病毒载量与疾病严重程度呈正相关，提示病毒定量有助于解释阳性检测结果的临床相关性[97,127-130]。虽然最近的研究显示rRT-PCR可以被用于临床标本中RV RNA的半定量，但对于呼吸道标本来说准确、绝对的定量是难以实现的，原因是：①缺乏准确量化的RNA检测国际参考标准；②RV株间的序列差异可能会影响实时荧光定量PCR扩增的效率；③样本采集过程无法标准化[131]。

3. 多重RT-PCR检测 近年来，出现了许多实验室开发的或商品化的多重RT-PCR检测方法，它们基于不同的扩增平台，结合多种呼吸道病原，其中包括其中包括RV。目前在美国有8个包含RV检测的商品化多重试剂盒被FDA批准用于体外诊断：the Luminex xTAG Respiratory Virus Panel（RVP）、Luminex xTAG RVP Fast、Luminex NxTAG Respiratory Pathogen Panel（RPP）（Luminex Molecular Diagnostics，Austin，TX）；the FilmArray Respiratory Panel（RP）、FilmArray RP2、FilmArray RP EZ（CLIA waived）、FilmArray RP2Plus（BioFire Diagnostics，Salt Lake City，UT）；the eSensor RVP and ePlex RPP（GenMark Dx，Carlsbad，CA）（表91-1）。

The Luminex xTAG RVPv1，xTAG RVP Fast和NxTAG RPP使用多重PCR进行扩增，然后使用液体微球阵列流式细胞术进行扩增子鉴定[132,133-135]，RVP分别可以检测12种和8种病毒类型及其亚型，RPP可以检测18种病毒类型及其亚型和3个靶向细菌。FilmArray RP将样本制备、扩增及检测集于一体，它利用一个预先加载的气泡袋固相阵列和端点熔化曲线分析方法在1h内可以检测20种不同的呼吸道病毒和细菌病原体。eSensor RVP根据竞争性的DNA杂交及电化学方法来检测14种不同呼吸道病毒及亚型，而ePlex RPP可以可以检测15种病毒和2种细菌。FilmArray RP、Luminex xTAG RVPv1、xTAG RVP Fast和ePlex RPP方法都不能区分肠道病毒和鼻病毒，而eSensor RVP据称可以特异性检测鼻病毒[136-137]。大多数商业化分子检测试剂都需要专门的仪器。相比之下，FTD呼吸道病原体多重检测方法通过标准的实时水解探针化学法和传统的实时荧光定量PCR仪检测21种呼吸道病原体，更易于整合到已经使用的标准化RT-PCR检测平台的工作流程中[138]。

目前，几乎没有临床实验室有兴趣或能力建立自己的检测RV的RT-PCR方法，即使有商品化检测试剂，但除非是包含在综合性的呼吸道病原内，不然一般也不使用这些检测试剂。

这些综合的多重检测方法证实，在培养阴性的临床标本中可频繁检出RV，并能发现许多病原体混合感染。然而，大多数方法都不是定量的，使用和维护的成本很高。每个商品化系统都有其独特的优点和缺点，所有使用者应该确定哪个系统才是适合自己实验室的。

表 91-1 呼吸道病原(包括鼻病毒)的商品化多重分子检测方法

公司	方法	U.S FDA[a]	专门的仪器	RT-PCR	检测	后续 PCR 处理	RV,EV RV/EV[b]	病毒/细菌检测种类	公司网址	关键文献
AutoGenomics	INFINITI RVP Plus	RUO	是	传统	固态阵列	否	RV (A/B)	25	www. autogenomics. com/	159
bioMérieux	FilmArray Respiratory Panel (RP)	IVD	是	实时	熔解曲线分析	否	RV/EV	20	www. biofiredx. com/	160
	FilmArray RP2	IVD	是	实时	同上	否	RV/EV	21		
	FilmArray RP EZ (CLIA waived)	IVD	是	实时	同上	否	RV/EV	14		
	FilmArray RP2Plus	IVD	是	实时	同上	否	RV/EV	22		
Fast Track Diagnostics	FTD Respiratory pathogens 21	RUO	否	实时	水解探针	否	RV/EV	21	www. fast－trackdiagnostics. com/	138
GenMark Dx	eSensor Respiratory Viral Panel	IVD	是	传统	电化学	是	RV	14	http://www. genmarkdx. com/	137
	ePlex Respiratory Pathogen Panel	IVD				否	RV/EV	17		161
iCubate	Respiratory-V Cassette	RUO	是	传统	固相阵列	否	RV, Cox/EcV	20	www. icubate. com/	
Luminex	xTag RVP & RVP Fast	IVD	是	传统	液相微球阵列	是	RV (A/B/C)/EV	美国(12 & 8);欧洲(18/16)	www. luminexcorp. com/	134, 162-164
	NxTAG Respiratory Pathogen Panel	IVD	是			否		20		136, 137, 163
	Verigene Respiratory Pathogens	RUO	是	传统	固相阵列	否	RV (A/B/C)/EV	15	www. nanosphere. us/	165
PathoFinder	RespiFinder SMART 22 & SMART 22 Fast	RUO	否	实时	熔解曲线分析	否	RV/EV	21	www. pathofinder. com/	166, 167
Qiagen	ResPLEX II	RUO	是	传统	液相微球阵列	是	RV, Cox/EcV	16	www. qiagen. com/	166
Seegene	Anyplex II RV16	RUO	否	实时	熔解曲线分析	否	RV(A, B, C),EV	16	www. seegene. com/	149
	Seeplex RV15 OneStep ACE Detection	RUO		传统	扩增大小	是		15		

注:[a] RUO. 仅科研用;IVD. 经 FDA 认证用于体外培养。[b] 基于公司资料;RV. 检测鼻病毒(种类未特定);EV. 检测肠道病毒;RV/EV. 检测鼻病毒和肠道病毒两种但不能区分;CoX/EcV. 检测柯萨奇 A 型、B 型病毒和埃可病毒;RT-PCR. 逆转录 PCR

尽管在区分肠道病毒和鼻病毒上投入了大量的努力，但在临床工作中，由于抗病毒药物对 2 种病毒属均有效，故设置一个可以同时检测 2 种病毒属的方法更有优势[42]。再者，肠道病毒[如 EV-D68 和柯萨奇 A21(CV-A21)]也可以引起呼吸道疾病[139-143]。因此，某些多重检测方法并未区分 2 种病毒属，而是同时检测两者（表 91-1)。

七、病毒分离

（一）细胞培养

A、B 种鼻病毒只能在人类或猴子来源的组织细胞中生长，C 种目前在传统的细胞培养中不能生长。虽然鼻病毒最初是从原代猴肾细胞中分离出来，但分离效率并不太一致。临床实验室最常用的细胞是人胚肺成纤维细胞株 WI-38 和 MRC-5[144]。WI-38 细胞比 MRC-5[101] 细胞敏感，但 MRC-5 细胞在临床实验室更易获得。鼻病毒在人胚肾细胞中也能复制，不同细胞对鼻病毒的敏感程度不同，可相差 100 倍以上[144]，而造成这种差异的原因尚不清楚。因此，为了获得最理想的结果，一般推荐同时使用至少两种敏感细胞做细胞培养。

在研究平台中，一些 HeLa 细胞克隆，如 HeLa M、Ohio HeLa、HeLa H、HeLa R-19 和 HeLaI 细胞，鼻病毒在这些细胞中可以复制并产生较高的滴度[101]。研究表明对于从临床标本中分离鼻病毒而言，HeLa I 细胞比 WI-38、MRC-5、胎儿扁桃体细胞 HeLa H 或 M 细胞更敏感[145]。最近一项研究表明，稳定表达 RV-CDHR3 受体的 HeLa-E8 细胞株可支持 RV-C 的增殖[15]。这些特殊的细胞系只能从研究实验室获得。

细胞接种标本后在一般的细胞培养液中培养，培养液可用 Eagle 基础培养基，加 2% 胎牛血清和抗微生物药物，pH 为中性。为了模拟鼻腔内的环境，培养物应在 33～35℃，通过转鼓上培养管中连续滚动培养以提供单层细胞的通气环境。接种标本后最早 24～48 h 可以观测到细胞病变效应(cytopathic effect，CPE)，一般在第 4 天可检测到 CPE。对于某些病毒株的分离，需要将感染的 HeLa 细胞在 CPE 出现之前进行传代。应用成纤维细胞比应用上皮细胞更易观察到细胞改变情况，病变出现得更早。镜下可观察到大或小圆细胞，折光性强，细胞核固缩，有细胞碎片(图 91-2)。鼻病毒 CPE 与肠道病毒 CPE 相似，有时会与非特异性改变混淆。CPE 期为 2～3 天，随血清型及接种材料不同而不同。值得注意的是若放置时间太长，病毒可能失活，CPE 退化，因此细胞应保持及时传代。在进行鉴别试验之前，传代有利于提高病毒的滴度。

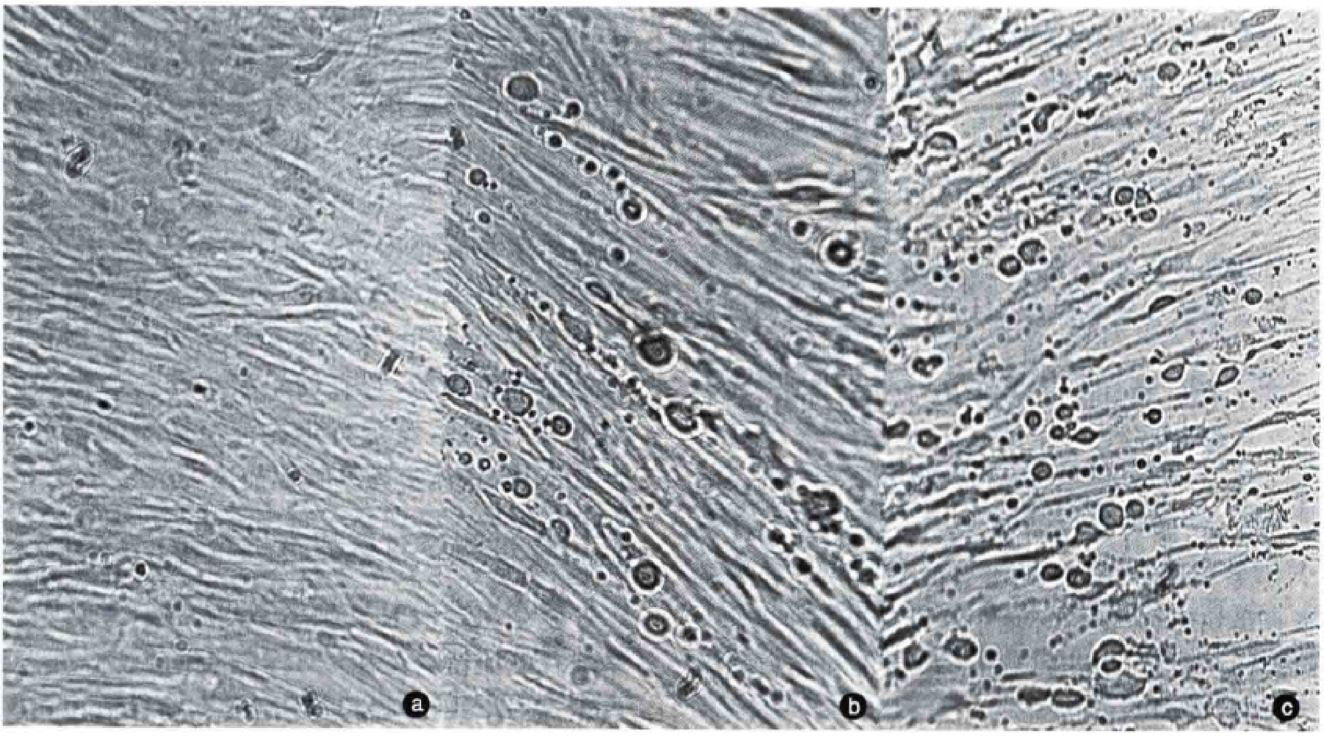


图 91-2 鼻病毒致人胚肺成纤维细胞的细胞病变

注：a. 未感染细胞；b. 鼻病毒致细胞病变的早期病灶；c. 鼻病毒致细胞严重病变(放大倍数，×100 倍)

人胚肺成纤维细胞应连续观察 14 天，但在第 7 天补充培养基可提高病毒收获量。HeLa 细胞只能培养 7～8 天，由于可能出现非特异细胞变性和圆缩，必须按时传代。

据报道，使用 HuH7 肝癌细胞系快速离心培养可以检测包括 HRV 在内的呼吸道病毒。在接种 4 天后，HRV 可以通过 RT-PCR 检测出，虽然结果出现更快，但在接种 14 天时，HuH7 细胞并不比 MRC-5 传统培养更敏感[109]。

(二)器官和分化上皮细胞培养

过去，当常用的细胞培养不能分离出病毒时，可以使用人胎儿鼻上皮或气管进行器官培养，但现在这种方法已不再使用。然而，最近从活检材料中获得的鼻腔、鼻窦、气管黏膜培养可用于鼻病毒发病机制的研究[10,12,146-147]。器官培养和液-气界面分化的人气道上皮细胞均可用于 RV-C 病毒的生长[13]。

八、鉴定

若出现特异性的 CPE，结合临床特征，可以判断是鼻病毒感染。在临床实验室，对鼻病毒分离株进一步鉴定主要是根据对酸性 pH 敏感性的不同区分它和肠病毒，但最近几年这种方法逐渐减少。中和试验鉴别血清型耗时、成本高，不提倡作为常规试验。除此之外，最近发现的 HRV-C 型在细胞培养中无法生长，也没有合适的中和血清。

(一)酸性 pH 稳定性

鼻病毒对低 pH 敏感，可以被灭活，而肠道病毒稳定。鼻病毒暴露在低 pH 环境下其病毒滴度可降低 2～3 $TCID_{50}$ 对数值。在进行这项试验前，应将分离株传代，使其滴度达到 10^3 $TCID_{50}$/ml。然后准备 2 种缓冲液，如 HEPES，一种 pH 为 3.0，一种 pH 为 7.0，各取 1.8 ml，分别加入 0.2 ml 未知病毒悬液，混匀，室温下放置 3 h，然后将 pH 调至 7.0，系列稀释，接种到培养的细胞中。若未知病毒是鼻病毒，则酸性环境中病毒滴度至少降低 2 个对数值。试验中应设已知的鼻病毒和肠道病毒作为对照，处理条件相同。

(二)温度敏感性

鼻病毒最佳生存温度为 33℃，将未知病毒变成两份，一份在 33℃ 条件下培养，一份在 37℃ 条件下培养，通过这一点可将鼻病毒和肠道病毒区分开。鼻病毒温度越低，CPE 出现越快，而且病毒滴度越高。然而，一些鼻病毒分离株可能并未表现出温度敏感性，所以这种检测方法也不在临床上使用[69]。

(三)免疫检测

在临床环境中，使用针对检测肠道病毒和鼻病毒的泛肠道病毒免疫荧光单克隆抗体和仅检测肠道病毒的特异性试剂平行对分离物进行染色，可以快速、准确地鉴定 11 份鼻病毒分离物[134]。

(四)RT-PCR 和实时 RT-PCR 进行病毒鉴定

针对 5′非编码区高保守序列的 RT-PCR 和 rRT-PCR 技术可用于 HRV 细胞培养分离株的鉴定，然而，和肠道病毒的交叉反应经常发生，尤其是高滴度的病毒分离株[43,148]。

九、分型系统

(一)通过病毒中和试验进行血清分型

通过使用型别特异的抗血清进行中和试验对鼻病毒进行血清分型的方法可以作为鼻病毒鉴定的金标准。然而，中和试验价格昂贵，工作量大，结果有时推迟数周，很少有实验室能获得特异性抗血清来开展此工作。RV-C 无法在标准的细胞培养体系中生长，且由于血清型之间的交叉反应使得结果解释很困难。血清分型需要 20 U 抗血清中和 30～100 $TCID_{50}$ 的病毒。高价免疫血清可以从 ATCC 获得，交叉反应血清库与鉴别肠道病毒的血清库相似，它有助于缩小分离病毒株的鉴定范围。因此，鉴定特定血清型需要使用单特异性抗血清，具体步骤见其他描述[149]。

(二)通过测序对鼻病毒进行基因分型

基于 RT-PCR 和扩增子测序的分子分型已基本取代了血清分型用于 RVs 的类型特异性鉴定。由于 RV VP1 衣壳蛋白中包含有与血清型相关的中和位点，所以建议利用完整的 VP1 序列来鉴定鼻病毒的基因型，通过这种方法鉴别出 RV-A、RV-B 和 RV-C 的核酸差异分别是 13%、12% 和

13%[27]。这种分型方法对现有的血清型别仅有轻微的改变(如血清型 A8/A95 和 A29/A44 和 A54/A98 重新分类后成为单一血清型)。然而,因为高度可变区位于 *VP1* 基因内及周边区域,很难设计一对通用引物可以成功扩增出鼻病毒所有的序列,当怀疑有新的型别出现时,通常需要设计新的引物并且优化反应条件[150]。由于 VP4/VP2 区域内存在高度保守区,可以此设计引物,对 VP4/VP2 衣壳蛋白基因测序进行基因分型已被广泛应用于大的流行病学研究[70,93]。总的来说,RV 种型及基于 VP4/VP2 核酸序列的型别鉴定与 VP1 基因型有很好的相关性[150]。

HRV 的 5′非编码区包括高度保守和可变序列,研究报道显示,对于临床标本鼻病毒的检测和分型,该序列是最敏感的靶标[90,99]。然而,由于 RV-A 和 RV-C 的序列可以在该区域发生重组,单靠 5′非编码区测序并不能明确判断 RV 的种及基因型,与衣壳蛋白编码区相比还易发生不一致的系统进化聚类[24-25,150]。

在一项研究急性呼吸道感染住院儿童鼻病毒不同型别分布的研究中[125],针对 *VP1* 基因的部分区域设计引物,应用该引物进行 RT-PCR,阳性标本再分型[150]。通过 VP1 RT-PCR 和测序技术鉴别了 74%的标本,阴性标本又通过针对 VP4/VP2 的引物进行检测,有 18%的样本可进行基因分型。剩余标本则通过 5′非编码区设计的引物检测,又有额外的 3%样本被检出。还有 5%的 RT-PCR 检测阳性标本通过各种方法都无法测序分型。临床标本出现多个 RV 型别时通过传统的 Sanger 测序方法很难获得明确的序列。第二代测序技术可能对识别混合性 RV 感染及研究 RV 重组和准种有用。

十、血清学试验

在临床环境中检测抗体反应作为鼻病毒诊断是不切实际的。由于鼻病毒有许多种血清型,而又缺乏通用的抗原,使得血清学试验病毒抗体相对困难。血清学也是回顾性的试验,因为抗体多在症状出现 1~3 周后才可以检测到,在鼻分泌物以 IgA 为主,在血清中以 IgG 为主[149]。研究显示,中和抗体检测是血清学诊断的金标准[151]。在对感染已知血清型 RV 志愿者的调查研究中发现,ELISA 方法可以使用特定血清型抗原检测血清和鼻中的 IgA 和 IgG,该方法比中和试验敏感 100~1000 倍[55]。详细操作可见其他部分[149]。

十一、抗病毒药物敏感性

许多抗病毒药在实验室中显示出抗 RVs 活性[152],然而,若药物不能以适当的方式给到感染部位,会降低临床效果,目前,治疗药物尚处于试验阶段。研究包括对自愿感染 RV 的人员鼻内给予可溶性 ICAM-1,鼻内使用异丙托溴铵(抗副交感神经药物),鼻内使用咪喹莫特,抗病毒药物与抗介质药物混合应用[38,153-155]。已开展松果菊(一种中药制剂)与锌片混合使用的人群效应研究[156]。虽然小 RNA 病毒衣壳结合剂,如普拉康纳利,在临床试验中显示对普通感冒有效[42],但还未通过批准在临床应用。最新的关于普拉康纳利鼻内喷雾的Ⅱ期临床试验结果仍未公布[152]。另一个衣壳结合剂,BTA-798 或 vipendavir,在 2010—2011 年已经成功通过Ⅱ期临床试验[98]。尽管 RV 3C 蛋白酶抑制剂已显示出强大的抗病毒活性,但芦平曲伟(pharmacodia)和 PI4KB 抑制剂 BF738735(galapagos,NV)的试验已经停止[152]。作为直接作用的抗病毒药物的替代品,例如,衣壳结合和蛋白酶抑制剂,以及靶向宿主抑制剂,如伊曲康唑与亲环素 A,目前正在研发中[157]。

十二、结果的评价、解释和报告

RV 诊断方法的对比见表 91-2。核酸扩增方法使 RV 检测发生了变革,显示 RV 感染普遍存在,同时与严重性疾病相关,促进临床研究及 RV C 型的发现。

在临床实验室很少检测鼻病毒,只有当临床诊断为流感或呼吸道合胞病毒感染时,有可能进行培养,并分离出鼻病毒株。2009 年流感流行后,对容易使用的、FDA 批准的呼吸道病毒分子诊断方法需求增大,许多商品化的多重呼吸道病毒试剂盒都包含鼻病毒。在这些试剂盒的使用中,鼻病毒经常是最多被检测出的病原体。频繁的检出甚至带给人们一种印象,即 RV 是正常菌群,可以被忽视。

表 91-2 鼻病毒诊断方法比较

方法	优点	缺点/限制	临床应用	关键文献
RT-PCR 或其他 NAAT[a]	与鼻病毒培养相比更敏感及快速 检测 HRV-C 新型别临床标本中检测鼻病毒最敏感的反应引物也可以检测肠道病毒	很难区分 HRV 和 HEV，可以报道为小核糖核酸病毒，EV-D68 可通过 RV 检测法检测出 因为其他病毒可引起相同的临床症状，也需检测	检测标准	表 91-1
	Real-time 方法与普通 PCR、巢氏 PCR 相比更快速、简便、污染率低	鼻病毒不同型别敏感性不同		
	多重检测方法可以检测多种呼吸道病毒，有些在 1 h 内就能得到结果 许多实验步骤可仪器自动化	多重检测技术对鼻病毒的高频率检出很难解释临床相关问题		
病毒分离	若无特殊要求可在培养基中传代	许多 HRV 血清型的选择培养需要其他敏感的细胞培养基，而非常规诊断实验室应用（如 HeLa Ohio 细胞，HeLa I 细胞，胎儿扁桃体）	适用于不使用分子方法的临床实验室	144，145
	HRV-A、HRV-B 可以在临床实验室用的普通细胞培养基中复制（如 WI-38，MRC-5，HEK）	通常敏感细胞的敏感性可以改变 100 倍以上		
	这些培养基也可以培养其他病毒（如 CMV、VZV、HSV、Adv、HEV、RSV）[b]	区分 HRV 和 HEV 的实验费时（如定量酸敏感试验） 最近发现的新型 HRV-C 在培养基上不生长		
组织培养	对发病机制的研究很有用	手术切除丢弃的鼻窦组织可以使用	应用于发病机制的研究	10
	可以使用活检或手术切除的组织	胎儿鼻或气管组织不易获得		
血清学检测抗体反应	可检测病毒分离无法鉴别的感染 作为已知感染鼻病毒血清型或流行病学研究中的实验工具	由于鼻病毒血清型多，缺乏共同抗原，且需要急性期和恢复期双份血清，抗体检测对临床诊断来说并不实际	仅用于研究	55，151

注：[a]RT-PCR. 逆转录 PCR；NAAT. 核酸扩增试验；[b] RV. 鼻病毒；EV. 肠道病毒；CMV. 巨细胞病毒；VZV. 水痘-带状疱疹病毒；HSV. 单纯疱疹病毒；RSV. 呼吸道合胞病毒

因此，对 RV 阳性 PCR 结果的解释是困难的。RVs 相当常见，常存在于无症状的患者中，但易引起一系列感染，且在症状消失后仍可排毒数周，甚至可出现与其他细菌、病毒的混合感染。某些患者 RV 阳性结果的解释需要依赖危险因素及其他病原的存在。虽然 RT-PCR 可以检测病毒载量以协助诊断其在急性疾病的作用，但目前还没有定量的标准和指南，且与患者个体无明显相关[97,128-131,158]。此外，包含 RV 呼吸道病毒检测试剂盒一般不能准确提供定量结果。

分子检测方法也不能准确区分鼻病毒和肠道病毒（表 91-1），这几种肠道病毒被认为是重要的呼吸道病原体[139,141,143]。虽然治疗无明显区别，但要区分鼻病毒与肠道病毒在病毒传播过程、感染控制措施、宿主内传播、诊断标本采集与呼吸道外疾病的关系等方面是否存在不同仍需要更多信息。

对于依靠细胞培养进 RV 诊断的实验室而言，虽然不敏感，但 RV-A、B 的分离可以通过使用传统的细胞系统如 WI-38、MRC-5 或 HEK 完成。病毒复制的最佳条件是在 33～35℃ 及旋转培养。肠道病毒和鼻病毒的 CPE 相似，但两者的酸稳定性不同，可以通过该实验区分，或者通过 RT-PCR 验证。

流行病学和实验研究可根据情况应用中和试验鉴定鼻病毒的血清型，也可通过测序为基础的分子诊断方法。血清学试验鼻病毒仅适用于科学研究。

分子诊断技术对检测 RV-C 及对鼻病毒作为引起下呼吸道疾病、哮喘及 COPD 急性加重的病原体的分析很有必要。然而，对于临床实验室，只有当价格合理、对住院患者鼻病毒诊断的意义凸显或治疗有效果时，鼻病毒检测才会成为实验室优先考虑的技术。

参考文献请扫二维码查阅

第92章　冠状病毒

NAOMI J. GADSBY, KATE E. TEMPLETON

（吴驰、曲久鑫　译；喻华　审校）

一、生物分类学

冠状病毒(coronaviruses,CoV)因其在电子显微镜(简称电镜)下所见病毒毒粒表面有类似日冕状的棘突而命名(图92-1)。冠状病毒科属于巢病毒目下四科之一,可分为2个亚科,即冠状病毒和环曲病毒。冠状病毒又可分为"阿尔法""贝塔""伽马"和"德尔塔"4个属[1-2]。贝塔冠状病毒可进一步分为A、B、C、D 4个系,但这4个系并没有正式的分类学属性。图92-2展示了目前已知的30种冠状病毒的系统发育关系[3]。目前为止,已发现6种人冠状病毒(human CoV,HCoVs)。阿尔法冠状病毒属(以前为冠状病毒1群)包含2种HCoVs,即HCoV-229E和HCoV-NL63,以及一些来源于蝙蝠、猪、狗和猫的CoVs。贝塔冠状病毒属(以前为冠状病毒2群)包含其余的HCoVs和许多其他哺乳动物CoVs。HCoV-OC43和HCoV-HKU1属于贝塔冠状病毒的A系,严重急性呼吸综合征CoV(severe acute respiratory syndrome related coronavirus,SARS-CoV)属于B系,中东呼吸综合征CoV(Middle East respiratory syndrome-related coronavirus,MERS-CoV)属于C系[4]。伽马冠状病毒属(以前为冠状病毒3群)和德尔塔冠状病毒属则以禽CoV占主导地位,虽然包含几个哺乳动物CoVs,但目前尚未见HCoV[2,5-6]。

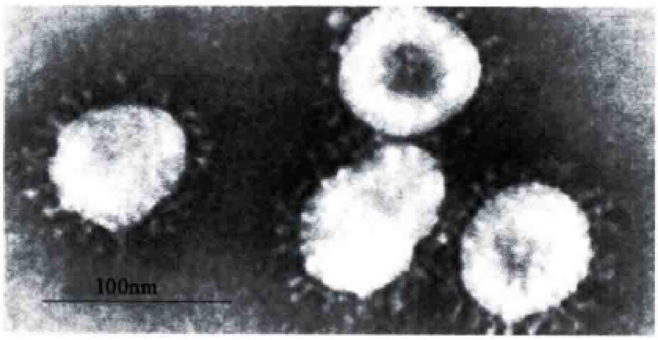


图92-1　冠状病毒HCoV-OC43电子显微镜下显示多种形态,表面有类似日冕状的棘突

二、病原体描述

(一)结构

冠状病毒的基因组较大,为非节段单链正向RNA,全长约30 kb[6]。复制酶基因位于5′端约占基因组长度的2/3,包含2个相互重叠的可读框(ORF1a和ORF1b),负责编码15～16个非结构蛋白。余下1/3基因组编码4～5种结构蛋白,主要由一个嵌套亚基因组mRNA和特定CoVs的额外附属基因翻译。病毒毒粒为球形或多形性,有包膜,其内由基因组RNA和核蛋白(N)构成,核衣壳呈卷曲螺旋状。棘突蛋白(S)长约20 nm,形如棒状,以三聚体形式镶嵌在病毒包膜中,称之为包膜粒,与病毒-细胞黏附相关。此外,病毒包膜表面还有2种蛋白,即膜蛋白(M)和壳蛋白(E)。贝塔冠状病毒属A系中的CoVs还具有另一种膜糖蛋白,血凝素-脂酶(hemagglutininesterase,HE),后者构成5～7 nm的短突起。CoVs的分子生物学近期已有综述[7]。MERS-CoV与SARS-CoV的区别在于其细胞结合受体为DPP4/CD26而非ACE2[8]。在肺细胞中已完成建立DPP 4作为受体的研究工作。

(二)来源

CoVs广泛存在于家禽、野生哺乳动物和鸟类中;然而,在鸟类和蝙蝠中毒株的特殊多样性提示这些动物是CoVs的天然宿主,虽然此结果可能存在采样偏差[2,6]。近期来源于蝙蝠CoVs的遗传

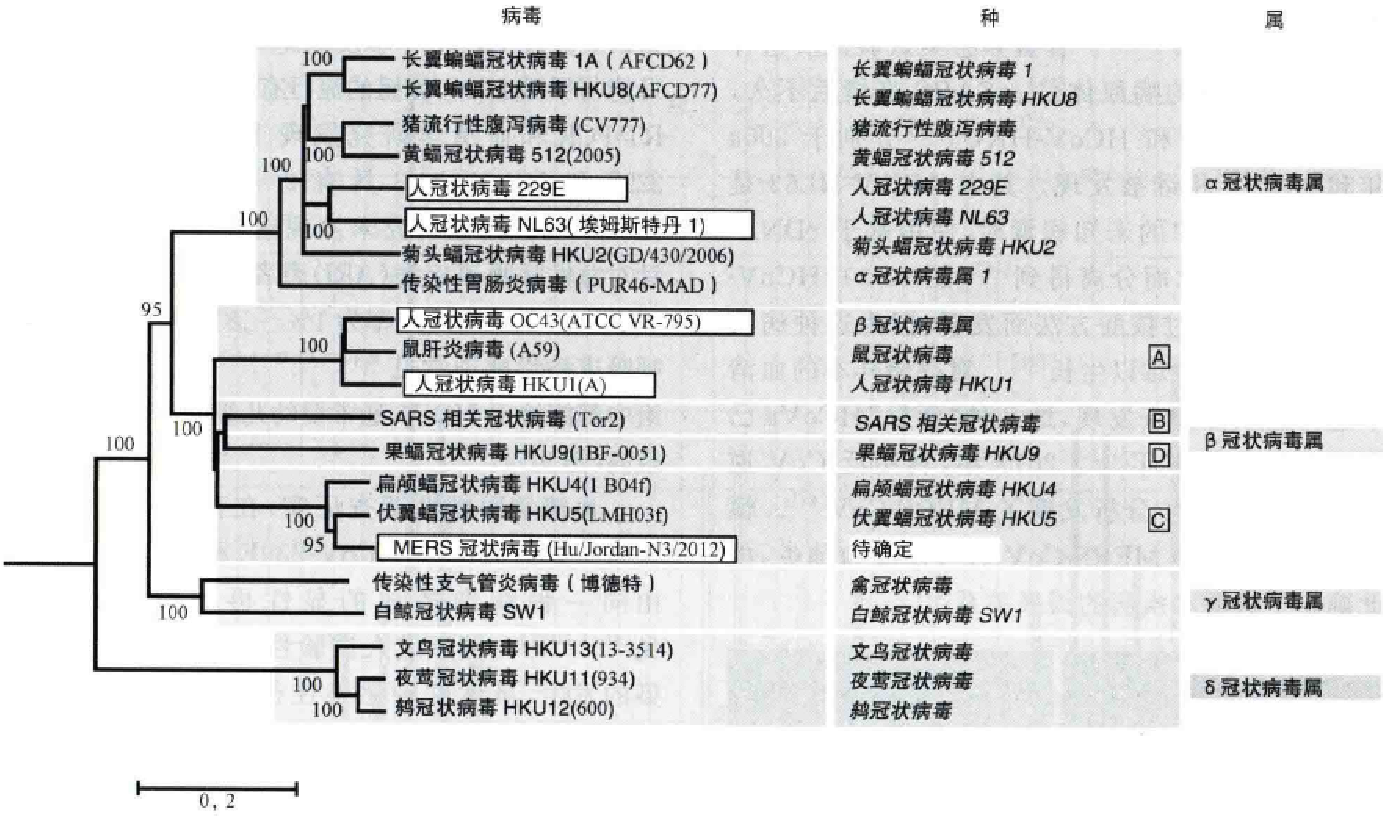


图 92-2 冠状病毒(CoV)亚科成员间系统发育关系图。有根邻接法根据 20 种 CoVs 多聚酶 ORF1b 编码的复制酶蛋白氨基酸序列构建系统发育树，代表当前已经认识的不同 CoV，包括最近发现的 MERS-CoV 病毒株 Hu/Jordan-N3/2012；bovine torovirus strain Breda 作为外群体(outgroup)描述。引导值≥95%的才显示出来。用括号内的特定病毒株来给病毒命名。病毒种和病毒属按常规用斜体表示。关系树显示冠状病毒分为 4 个属，分别为 α、β、γ 和 δ。图中还显示了 beta 冠状病毒分为 A～D 4 个系(代表以前分类中的亚群 2A～D)。[根据参考文献[3]修改，并得到 R. J. de Groot 允许引用。译者注：新型冠状病毒(SARS-CoV-2)发育关系见 J Mol Biol. 2020，432(10)：3309-3325.]

分析结果表明，HCoV-229E 与 HCoV-NL63 均为动物源性[9-11]，特别是 HCoV-229E 起源于蝙蝠，骆驼可能为其中间宿主[11-12]。HCoV-OC43 是贝塔冠状病毒属的亚种，与其他家畜类 CoVs 关系密切，特别是牛 CoV，可引起由牛到人的传播[13]。HCoV-OC43 以频繁的重组为进化特征，目前已发现 7 个不同的基因型(A～G)[14]。与贝塔冠状病毒 A 系中的 HCoV-OC43 不同，HCoV-HKU1 的来源仍然未知[15]，尽管啮齿动物 CoV 可能是这个谱系的祖先[16]。贝塔冠状病毒属 B 系包括人源的 SARS-CoV，以及果子狸、雪貂、獾和蝙蝠中的 CoVs[2,17-18]。SARS-CoV 可能是通过天然宿主为中国菊头蝠的类 SARS-CoV 发生重组后，进入中国南方野生动物(如果子狸)市场造成的人畜传播[17-20]。MERS-CoV 的进化起源可能来自蝙蝠[21-22]，但目前认为其传播给人的动物来源是其中间宿主——骆驼，研究显示，中东与部分非洲地区的单峰驼中检测出高 MERS-CoV 血清和病毒阳性率[23-26]。尽管其传播路径尚不明确，基因组分析提示在沙特阿拉伯出现了多起散发的 MERS-CoV 人群感染，以及人与人传播[27-28]。

(三)冠状病毒的发现

20 世纪 60 年代，从英国和美国的呼吸道感染患者体内分离出一系列病毒株。不同于已知的呼吸道病毒，这些病毒具有特殊的细胞病变、形态和生物学特性[29-31]。这些病毒的分离十分困难，常需要使用原代器官培养。它们的形态学和生物学特点相近，与鼠肝炎病毒、传染性支气管炎病毒关系紧密。最终，冠状病毒作为一种新的病毒在 1968 年得以命名。随后，HCoV-229E 和 HCoV-OC43 得到了较完善的研究，这部分得益于病毒已有的(HCoV-229E)或后续适应的(HCoV-OC43)体外繁殖能力[29-30,32]。SARS-CoV 于 2003 年从患者呼吸标本的细胞培养物中分离得到，它在电

镜下具有 CoV 样形态，但通过序列分析证实其是一种新型的 CoV[33-38]。食蟹猴感染试验证实这种病毒是 SARS 的病原体[39]。SARS 疫情后不久，HCoV-NL63[40] 和 HCoV-HKU1[41] 分别于 2004 年和 2005 年相继被发现。其中，HCoV-NL63 是在鉴定培养物中的未知病毒时，使用基于 cDNA-AFLP 的新技术而分离得到[40]（图 92-3）；HCoV-HKU1 仅是通过核酸方法而发现，因为这种病毒在传统细胞系中难以生长[41]。对存储样本的血清学进行回顾性调查发现，这 2 种"新发"HCoVs 已在人群中流行多年[42]。2012 年，利用泛 CoV 逆转录 PCR 和遗传分析发现了 MERS-CoV[43]。恒河猴试验性感染 MERS-CoV 后可发展为肺炎，由此确定了病毒和疾病的因果关系[44]。

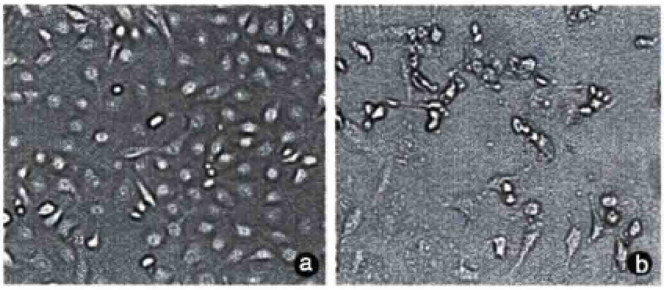


图 92-3 HCoV 病毒感染 5 天后的细胞病变效应

注：a. 未感染的 LLC-MK2 细胞；b. HCoV-NL63 病毒感染后的 LLC-MK2 细胞

三、流行病学和传播

HCoV-229E、HCoV-OC43、HCoV-NL63 和 HCoV-HKU1 是常见的人际间传播的病毒。相比之下，直到 2004 年初，SARS-CoV 才被发现，MERS-CoV 则是近期刚刚出现。4 种流行性 HCoVs 在全球均有分布[45-49]。数十年前开展的血清学调查结果表明，HCoV 感染率在不同年份间波动，与夏季相比，冬季时血清学反应率更高。随着 RT-PCR 方法学的出现，现已确认 HCoV 检出率和优势型别具有时间和地理上的多样性。这种多变性使得 HCoVs 感染的负荷度与周期性难以在 1 或 2 年的流行病学研究中获得结论。而且，近期研究发现 4 种流行性 HCoVs 长期同时存在。多年来在儿童及成人的分子生物学研究发现，4 种流行性 HCoVs 的 RT-PCR 检出高峰多出现在冬春季节，其中，HCoV-OC43 和 HCoV-NL63 为最常见的型别[42,45-46,50-58]（图 92-4）。还有研究发现 HCoV-229E 和 HCoV-HKU1 有更高的发病率[59]。荷兰的一项大型研究发现 HCoV 冬季发病高峰的强度和持续时间可能与甲型 H_1N_1 流感的流行有相关性[60]，同时部分 RT-PCR 和血清学研究发现 HCoV-NL63、HCoV-229E 和 HCoV-OC43 具有 2～3 年的流行周期性[57,61-63]，但其他研究未发现这种规律性[42,45,53,58]。针对急性呼吸道疾病（ARI）患者进行的长期研究发现 HCoV 的综合检出率为 1%～18%，而且合并其他呼吸道病毒感染常见[45-46,51-53,55-56,59]。尽管各个年龄组中都能检出 HCoV，通常婴幼儿组的 HCoV 检出率最高（图 92-4）[56]。

血清学回顾性调查证实，在存在中和抗体的背景下也可以感染 HCoV-229E 和 HCoV-OC43，由同一种病毒造成的显性再次感染也很常见[61-62,64-65]。健康成人试验性接种可导致再次感染的发生，虽然这种感染往往是亚临床型的[66]。针对儿童的纵向研究发现，在 HCoV-229E 和 HCoV-OC43 病毒血清抗体阳性的孩子中，有一半是没有症状的，这表明亚临床感染是自然存在的[61-62]。同期血清学研究也表明，HCoVs 感染在儿童早期是十分常见的，4 种 HCoVs 的血清阳性率随年龄增长而升高。对 25 个健康婴儿的研究发现，到 20 月龄时，24 个婴儿发生了至少一种针对 HCoV 的血清转换[51]。虽然采用 RT-PCR 检测发现 HCoV-OC43 和 HCoV-NL63 的血清转换率高于 HCoV-229E 和 HCoV-HKU1[51]。HCoV 在婴儿中感染的顺序很关键，先感染 HCoV-OC43 或 HCoV-NL63 可以诱导保护性免疫，对随后的 HCoV-HKU1 或 HCoV-229E 感染有保护作用，反之则不成立[51]。针对不同人群，2 个独立具有代表性的血清流行病学横断面调查发现，0～6 月龄，存在 HCoV-229E 和 HCoV-NL63 抗体的婴儿的比例显著下降，随后快速上升，以至于到 4 岁时，超过 50%的儿童针对 2 种病毒都是血清阳性的[67-68]。很可能，这种抗体分布模式表明母体抗体逐渐衰减，随后在儿童早期又针对感染产生了新的抗体。一些研究报道，成人中 HCoV-229E，HCoV-NL63 和 HCoV-OC43 的血清阳性率高达 90%～100%，而 HCoV-HKU1 的血清阳性率较低，为 59%～91%[69]。然而，也有研究报道了针对全部 4 种 HCoVs 更低的血清阳性率[68,70-72]。这些研究差异可能是由于人群、地理位置、试验方法敏感性和特异性的不同而造成。

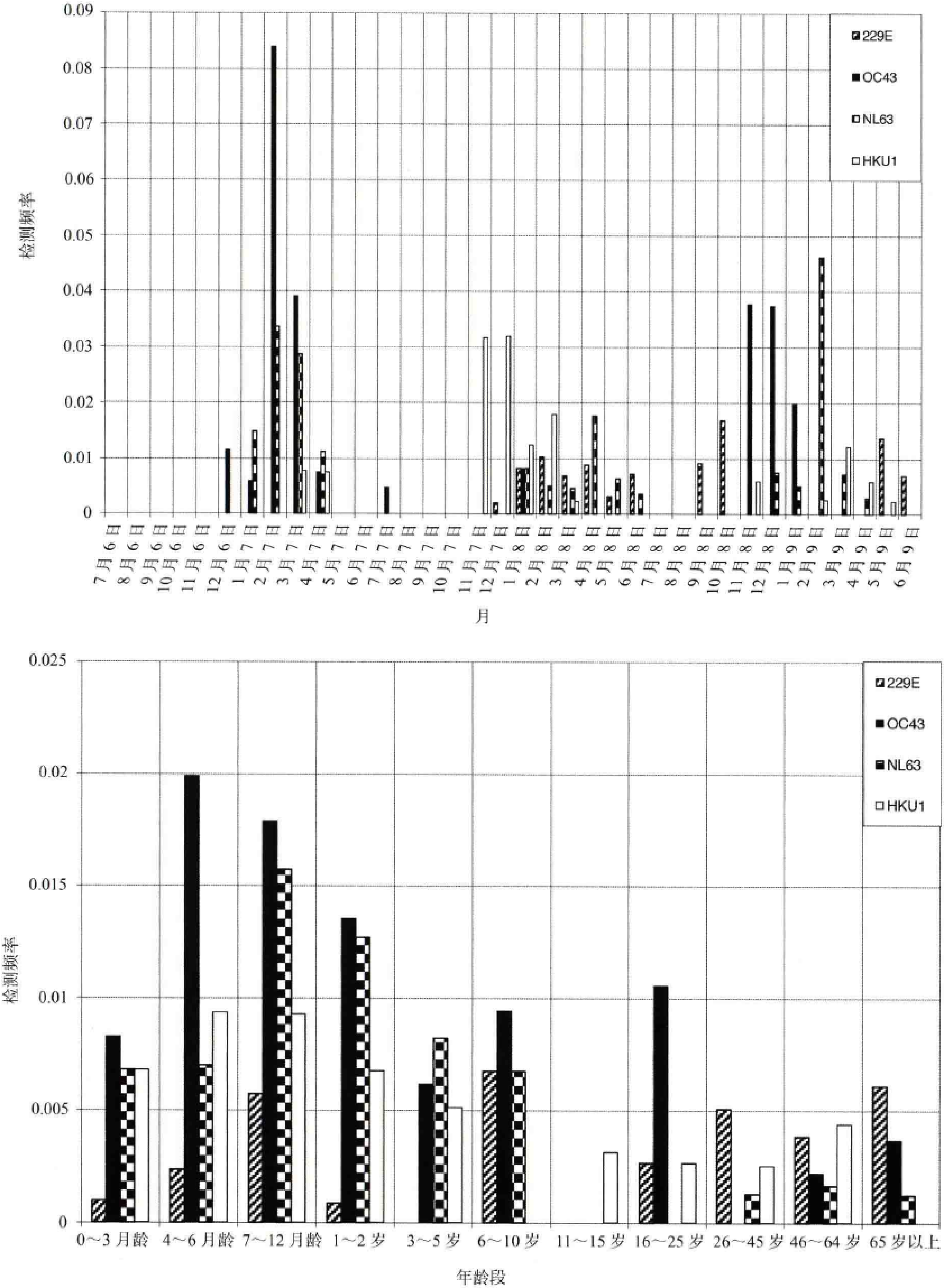


图 92-4 2006—2009 年，英国爱丁堡 3 年间 HCoV 病毒检出率(采用多重实时 RT-PCR 方法)随月份和年龄的变化规律。在此期间，共检测 11 661 份标本，其中 61 份标本 HCoV-HKU1 阳性，99 份标本 HCoV-OC43 阳性，35 份标本 HCoV-229E 阳性，75 份标本 HCoV-NL63 阳性(引自参考文献[46])

尽管 CoVs 在多数动物中通过粪-口途径传播，并可以在呼吸道和肠道上皮细胞中复制，但 HCoV 的主要传播途径可能是经呼吸道传播。虽然也有从粪便中分离出 HCoVs 的报道，但 HCoVs 经粪-口传播的程度尚不明确。利用 RT-PCR 方法可以在发病后 3 周的呼吸道分泌物中检测到 HCoV 核酸，尤其是处于免疫抑制状态的患者和新生儿；然而，并不能明确是否为活病毒[73-74]。HCoVs 可以在无生命表面[75]、悬浮液[76]或气溶胶中存活[77]，因此，病毒可能在环境中通过接触和气溶胶介导传播。在老年医疗机构，以及新生儿和儿科重症监护病房，HCoV 病毒院内感染的暴发流行可出现重症病例[78]。健康成人鼻内接种试验发现，HCoV-229E、HCoV-OC43 及相关毒株的典型潜伏期为 2～5 天；其他常见 HCoVs 感染、其他人群（如儿童）的研究还有待完善。

2002 年，一种新的、动物源的 SARS-CoV 首先在中国广东出现，并通过人传人的传播方式在短时间内迅速传遍全球。可能是由于病毒 S 蛋白受体结合结构域的突变，导致 SARS-CoV 获得了人传人的能力[79]。在医院、酒店和居民区中，由已出现症状的感染者导致的超级传播，是造成全球流行的主要原因，而社区人群中无症状血清阳性比例低[36]。最初的流行病学调查表明，可能的传播途径是直接或间接接触呼吸道飞沫[37]。气溶胶的产生，特别是在医院的环境，对于病毒的传播也很重要。SARS-CoV 可以通过呼吸道标本、粪便、尿和其他体液排出体外，与其他呼吸道病毒不同，其排毒高峰出现在发病的第 2 周[80]。此时，患者已出现症状并可能已在医院，这也是病毒感染力的高峰期。积极采取公共卫生方法，包括快速鉴定和隔离，以及改进的感染控制措施，使疫情在 2003 年中得到控制。2003 年底，SARS-CoV 可能通过新的动物传播方式在广东省短暂出现，随后，SARS-CoV 实验室传播也有发生。尽管个别病例的潜伏期更长，SARS 感染的潜伏期一般为 2～14 天，平均 4～5 天[36-37]。

2012 年 6 月，从沙特阿拉伯王国一个重症肺炎住院患者中首次分离出 MERS-CoV[43]，但其实针对 2012 年 4 月约旦暴发的一起重症肺炎院内感染的回顾性调查发现，患者样本中已经检测到 MERS-CoV[81]。目前已有 27 个国家报道了病例，患者主要是在阿拉伯半岛居住或旅行，80% 报道的病例来自于沙特阿拉伯。在沙特阿拉伯，除去职业接触过单峰驼的人之外，人群总体的血清感染率非常低[82]。病例报道为散在或聚集发病，部分而非全部病例发现有直接接触单峰驼病史[83]。生骆驼制品，如肉和奶，也可能具有潜在的传染性。尽管目前尚未观察到持续的人-人传播，在密切接触病例中已证实 MERS-CoV 具备有限的人传人能力[84]。严重的院内 MERS-CoV 感染暴发也有发生，最大的一起发生在 2015 年，地点为韩国[85]。与 SARS 一样，MERS-CoV 的传播与采取隔离时间和少数医院发生的超级传播事件有关[86]。因此推荐按照气溶胶防护程序，针对接触和飞沫进行防护[87]。MERS-CoV 感染的潜伏期中位数估计为 7 天，多数病例为 2～15 天[88]。呼吸道中 MERS-CoV 病毒载量的峰值和脱落模式与 SARS-CoV 相似，例外的是在尿和粪便中 MERS-CoV 的检出率明显更低[89]。

四、临床意义

流行性 HCoVs 包括 HCoV-229E、HCoV-OC43、HCoV-NL63 和 HCoV-HKU1，可引起所有年龄人群的上呼吸道感染（upper respiratory tract infection，URTI），偶尔也能造成下呼吸道感染（lower respiratory tract infection，LRTI）。HCoV-229E 和 HCoV-OC43 最初是从轻症上呼吸道感染成人患者中分离出来，在人体试验中被证实可引起普通感冒的症状[29-30,90-91]。由于未开展类似试验，尚未正式证实 HCoV-NL63 和 HCoV-HKU1 与疾病的因果关系。4 种流行性 HCoVs 均可引起相似的上呼吸道症状，如发热、咳嗽、咽痛、鼻塞和流鼻涕[47]，其中 HCoV-NL63 与儿童急性喉气管支气管炎相关[49,63,92-94]。大量流行病学研究证实所有 4 种流行性 HCoVs 均与急性呼吸道感染（ARI）有关，同时，与无症状对照组相比，ARI 感染患者中 HCoV 检出率更高[45]。然而，也有研究发现住院患者 HCoV 检出率与对照组相当或偏低，均为 2%～10%[49,95-96]。考虑到在大多数病例对照研究中，HCoV 的检出率相对较低，并且常见与其他呼吸道病毒的共感染，目前尚难得出 HCoV 与 ARI 的确定关系。但是，对于明确的 LRTI（如社区获得性肺炎和细支气管炎），现已证实在住院成人和儿童中，流行性 HCoV 可作

为单一病原[93,97-99]。同时，在处于免疫抑制状态、有基础病和年龄两极患者的 LRTI 中，HCoV 也有显著的发病率[42,46,52,97,100-101]。与其他呼吸道病毒(如腺病毒、流感病毒和呼吸道合胞病毒)相比，由流行性 HCoVs 造成的重症感染相对较少[102-103]。

虽然某些动物 CoVs 可引起腹泻，但 HCoV 与肠道感染的关系并不明确。目前认为 HCoVs 在胃肠道疾病中，即使存在，也只发挥很小的作用。在粪便标本中，利用电镜可以观察到 CoV 样颗粒，同时在胃肠道疾病患者中可分离出与贝塔冠状病毒属牛 CoV 和 HCoV-OC43 近源的人"肠道"CoVs[74,104-105]。近年来，研究工作主要集中在针对 4 种流行性 HCoVs 的 RT-PCR 检测，尽管偶尔可以在急性胃肠炎病例中检测到，但对照组也有与之相当的极低的检出率[106-108]。某些动物 CoVs 可造成神经感染，脑组织中也可检测到 HCoV-OC43 和 HCoV-229E 的 RNA，近期有报道 1 例免疫缺陷儿童感染了 HCoV-OC43 并合并致死性脑炎[109]。

SARS-CoV 和 MERS-CoV 可引起严重的呼吸疾病，病死率高。在 SARS 流行期间，病毒蔓延至 26 个国家和地区，造成约 8000 例临床病例，其中约 700 人死亡。SARS 的典型临床表现是以病毒性呼吸疾病起病，包括发热、乏力和干咳，随后快速进展为呼吸恶化的非典型肺炎。腹泻和淋巴细胞减少也是其临床特点。总体的病死率为 10%。和成人相比，儿童患者的症状更轻[110]。MERS-CoV 主要感染有基础疾病的成人患者，虽然从轻症到重症病例均有报道，但到目前为止，大多数为临床重症病例[111-112]。MERS-CoV 感染在儿童中偶有发现，是典型的接触成人患者引起的无症状感染[113]。截至目前，共计 1952 例已经实验室确认的 MERS-CoV 感染病例，其中 693 例死亡，总体病死率约为 35%。其典型临床表现为以发热和咳嗽为主的病毒性感染起病，随后几天内即可进展为呼吸恶化的肺炎[111]。严重的并发症包括肾衰竭、急性呼吸窘迫综合征并伴有休克和少见的神经系统疾病[111-112,114]。胃肠道症状较为常见，并伴有淋巴细胞减少和其他的血液学异常[111-112]。感染 MERS-CoV 的孕产妇可能发生不良的孕期或围产期结局[115]。

由于没有特异性治疗手段，对于重症 HCoV 感染的临床处置关键是提供良好的支持性治疗。一些潜在的抗 SARS-CoV 治疗制剂，如病毒蛋白抑制剂、干扰素和抗体，已在体外和动物模型中完成了评估[116]。在 SARS 暴发期间，针对感染患者采取了几种试验性治疗方案，但回顾性研究发现，这些治疗并没有获得实质性的阳性效果，甚至可能造成潜在的危害[117]。MERS-CoV 的某些重要的生物学特性与 SARS-CoV 有所不同，因此，潜在的治疗方案，如采用恢复期血浆、干扰素联合或不联合利巴韦林、洛匹那韦或利托那韦，目前仍在研究中[118]。

五、标本的采集、运输和储存

在一系列常规上呼吸道(URT)和下呼吸道(LRT)标本中均可检测到 HCoVs，如鼻咽拭子、鼻咽吸出物、鼻冲洗液和支气管肺泡灌洗液(BAL)。此外，在尿、血液、肺组织活检和尸检组织中也可检测到 CoVs。与 URT 标本相比，SARS-CoV 和 MERS-CoV 在 LRT 标本中的病毒载量和 RT-PCR 阳性率更高，在病程第二周检测的病毒载量和 RT-PCR 阳性率也更高。因此，对于 2 种病毒的检测都应尽可能优先采集 LRT 标本，同时进行多位点和多时间点的样本采集，以提高阳性率。具体针对 MERS-CoV 的诊断，推荐用 URT 标本、LRT 标本和血清进行 RT-PCR 检测，同时应采集急性期和恢复期血清进行回顾性的血清诊断确认[119]。样本采集时必须遵守相应的感染控制预防措施，特别是在易产生气溶胶的操作环节。

标本的运输应执行生物物质 B 类 UN3373 标准，其包装需符合 P650 要求[120]。直接检测 HCoV 的标本要在生物安全 2 级(biosafety level 2，BSL2)的实验室中使用 BSL2 操作程序处理，并要使用生物安全柜以防止可能产生的气溶胶污染。但如果怀疑是 SARS-CoV、MERS-CoV 或其他新型 CoV 的感染，最初的感染性标本(呼吸道标本、粪便和尿)的处理只能在生物安全 3 级(BSL3)设施内开展，一旦样品被裂解，后续操作可在 BSL2 实验室进行。此外，病毒分离培养只能在具备相关培训经验的实验室进行，且使用活体病毒进行的操作必须在 BSL3 设施内开展，并严格遵循 BSL3 操作程序。为了减少实验室获得性感染新型 CoV 的风险，推荐使用核酸检测方法，因

为此种方法不需要病毒繁殖，且在核酸提取过程中已将病毒灭活。此外，可以在裂解缓冲液中进行呼吸道标本的收集、运输和处理，以便在诊断操作的最早期即将病毒灭活。

六、直接检测

（一）显微镜检查

CoVs 毒粒呈球形或多形性，直径约 80 nm，包膜表面分布棘突，形成类似“日冕”样的特征形态（图 92-1），可借助电镜进行鉴别。薄片和负染电镜主要用来对体外增殖的 HCoVs 进行鉴定和特征描述，而不是直接检测标本中的病毒[29-30,34]。细胞培养可确保病毒繁殖到足够进行电镜检测的水平，因此，电镜很少用于直接检测呼吸道标本。但是，尽管其他直接检测方法更适于常规诊断，一些实验室针对粪便标本仍然开展 CoVs 的直接电镜镜检。电镜被认为是最适合作为寻找新型 CoVs 的补充方法。

（二）抗原检测

在所有检测方法中，抗原检测是最快速的。临床标本中的 HCoV 抗原可通过连接带标记单克隆抗体的检测系统（如显微镜）进行直接鉴定。对于未开展分子生物学检测的实验室来说，抗原检测比大多数核酸检测方法更为便捷。然而，已开发的检测 SARS-CoV 的试剂还是以内部使用为主，大多数是基于酶联免疫形式，以含量较大的核衣壳蛋白（N）为靶点。其中，基于化学发光检测和单克隆抗体的酶联免疫方法尤为有效[121]，在发病的第 3 周，约 60%患者的血液中可以检测到 SARS-CoV 的 N 抗原[122]。其他基于酶联免疫吸附试验（enzyme linked immunosorbent assay，ELISA）的抗原检测方法可以在鼻咽吸出物和粪便标本中检测到 SARS-CoV 的 N 抗原，尤其在发病 10 天后，但几乎不会在尿标本中检测到[123]。此外，也有报道利用间接荧光试验（indirect fluorescent assay，IFA）检测咽拭子标本中细胞组成的免疫荧光[124]。流行性 HCoV 单克隆抗体 IFA 或 DFA 检测的敏感性因病毒种类的差别而不同，但大体低于 RT-PCR 法[125]。新近报道，基于 ELISA 原理，已开发一种检测 HCoV-229E 和 HCoV-NL63 病毒 N 抗原的试验方法[126]，以及一种快速检测 MERS-CoV 病毒 N 蛋白抗原的实验方法[127]，但这些方法尚未进行完备的临床评估。

（三）核酸检测

目前，直接检测临床标本中 HCoV 的核酸是临床上最为常见的诊断方法。和其他方法相比，核酸检测具有更高的敏感性和特异性，既不需要依靠抗原与可能具有交叉反应性的抗体结合，也不要检测个体中及时、特异的免疫反应。HCoV 的核酸扩增试验（nucleic acid amplification tests，NAATs）包含 2 个策略：第一种选取一个在所有已知 HCoVs 中尽可能保守的靶点，进行“泛 CoV”检测；第二种是选择一段代表不同 HCoV 种间差异的基因组序列，进行一系列的“种特异性”检测。随着我们对 HCoVs 作为呼吸道病原体认识逐渐加深，理论上，在待诊断临床标本中所有这 4 种流行性 HCoVs 都应该筛查。近期，通过核酸检测方法的应用，特别是从培养物中进行随机核酸扩增和测序，然后通过数据库比对进而检测新型 CoVs 的能力，使人们对于 HCoVs 的研究取得了显著进展[43]。虽然已经可以针对呼吸道标本直接进行全基因组测序[41]，但目前在大多数临床实验室中极少开展。

1. “泛 CoV”检测 “泛 CoV”检测可以检测到 CoV 感染，但不能明确具体的病毒种。位于复制酶 ORF1a/b 中的聚合酶基因保守区被成功用于“泛 CoV”试验，通过在已知序列之间进行比对，进而设计出通用引物。一些“泛 CoV”试验使用简并引物[55]，一些利用多种引物组合[97]，其他的则仅使用单一组非简并引物[41]。使用的简并引物越多，检测已知 HCoVs 的敏感性越低，但检测到亲缘关系较远的 CoVs 的可能性越高。虽然一些“泛 CoV”试验具有与各自种特异性检测试验相同的敏感性[97]，但是，不同的“泛 CoV”试验检测已知 HCoVs 的能力不同[128]。因此，方法的选择取决于诊断目的。“泛 CoV”试验主要用来进行初筛[97]，也可以检测细胞培养物中的未知病毒，进而发现新的 HCoVs[41]。为了明确 CoV 病毒种，需要将“泛 CoV”试验的扩增产物进行测序、限制性酶切或探针杂交，阳性标本需要进行进一步的种特异性检测[129]。

2. 种特异性检测 种特异性 NAATs 十分灵敏，可以在不需要测序或扩增后处理的情况下完

成种水平的鉴定。此种检测的缺点是可能无法发现那些在序列上有差异的新发的CoVs，对于"泛CoV"NAATs也可能出现这种情况。同时，在不损失敏感性的条件，可以在一次反应中进行多个种特异性试验的多重检测，以节约成本和操作时间[46]。但对于其他一些种特异性试验，独立检测时其敏感性更高[48,130]。因此，一个独立实验室在建立HCoV检测试验时，需评估这2种方式的性能，以找到最优组合。对于HCoVs个体特异性检测，最常用的靶点是*N*基因，一些试验也尝试了膜蛋白(M)基因、聚合酶基因(ORF1a/b)和棘突蛋白(S)基因，最近有试验采用转录水平高的5′UTR前导序列[131]。

3. 实验室内部使用的NAATs HCoV的NAATs主要利用PCR技术。鉴于HCoVs含有RNA基因组，因此需要进行一次初始逆转录，既可分开操作(两步法RT-PCR)，也可和PCR检测结合在一起(一步法RT-PCR)。为了提高敏感性和特异性，目前诊断应用的几种HCoV RT-PCRs是"巢式"设计，因此，对外部引物初始扩增获得的产物，需要使用内部引物进行再次扩增[46]。传统上，结合使用凝胶电泳和预期大小的DNA条带紫外线下影像，对于扩增产物进行检测。对于"泛CoV"试验，也可以使用包含杂交探针的低密度芯片进行产物检测[132]。实时RT-PCR的出现可实时监测扩增产物，主要包括2种方式：一是染料法，即在dsDNA中非特异地嵌入荧光染料[93,133]；二是探针法，即在反应体系中加入与新生DNA以序列特异性方式结合的荧光探针，后者通过多种机制(水解法最为常见)发出荧光[46,131]。实时RT-PCR的优势是闭管操作，扩增后不需打开反应管，因此，可以减少实验室环境中发生DNA模板和产物污染的概率，并降低假阳性率。此外，由于将核酸扩增和产物检测结合在一步进行，实时RT-PCR比传统方法更快捷，且需要更少的人工操作时间。与常规RT-PCR[134]和巢式RT-PCR[46,135]相比，实时RT-PCR具有相同甚至更高的敏感性。在表92-1中列举出检测4种流行性HCoVs的实时RT-PCR方法。实时RT-PCR的结果可以定量，虽然在常规诊断中不需要明确HCoV病毒载量，但作为一个进展性标志物，病毒载量对于新发CoVs引起的重症疾病的描述是有帮助的。

基于非PCR的NAATs并不多见，但已成功开发出一些使用等温扩增的方法，如环介导等温扩增(loop-mediated isothermal amplification，LAMP)，并且更适用于资源短缺的情况。基于LAMP方法检测HCoV-NL63，不仅操作简便、成本低，同时其敏感性与实时RT-PCR相当[136]。多数情况下，HCoV核酸扩增检测方法是由诊断实验室内部开发，或改良其他实验室发表的方法而获得，但不论哪一种方式，其方法开发、验证、评估和常规使用中持续的技术支持，都需要有技能的科学人员投入大量时间。然而，内部检测方法运行经济，并可根据已知HCoVs中寡核苷酸结合位点变异快速改良，并在获得基因序列数据后，也可快速开发出新发HCoVs(如SARS-CoV和MERS-CoV)的检测试剂。

4. 商品化NAATs 近5年，受益于症候群诊断方法中呼吸道病毒组合的发展，HCoV核酸检测试剂在数量和种类上都有了很大提升(表92-2)。所有呼吸道病毒都可以引起一系列症状和并发症，并且由不同病毒引起的ARI的临床特点通常无法区分。尽管单价高昂，大的商业检测组合能够在一份样本中同时检测一组病毒，可以在常规检测中和暴发流行时，切实可行地替代多种内部实时PCR试剂的使用[137]。商业试剂在操作时间上有着显著差异，有的需要每个样本多于一管反应，有的特别适用于高通量(如xTAG RVP Fast；Luminex，Austin，TX)或低通量(如Filmarray Respiratory panel；BioFire，Salt Lake City，UT)。在需要使用经监管机构批准的体外诊断试剂和(或)没有分子生物学经验的实验室，商业试剂作为传统培养法和免疫荧光法的替代，具有特殊的吸引力。然而，特别是对于HCoV检测试剂，尽管许多通过了欧洲的CE认证，但很少获得美国FDA的批准，同时，并不是所有试剂可以同时检测全部4种流行性HCoVs(表92-2)。对HCoV核酸检测的商业和内部使用试剂的直接对比展示了在性能上的差异，但由于多数对比缺少阳性样本，尤其是个别种，导致很难获得不同HCoVs检测方法敏感性优劣结论[137-140]。这是一个快速发展的领域，在不久的将来，新的商品试剂或已有试剂的改进型将会陆续进入市场。

表 92-1 已发表的利用不同的靶基因采用实时 RT-PCR 方法检测流行性 HCoVs 的例子[a]

文献	病毒	靶基因	核酸序列	检测方式	已报道的检测敏感性
Gaunt，等 . 2010[46]	HCoV-229E	M	For:CATACTATCAACCCATTCAACAAG	多重一步法实时 RT-PCR，ABI 7500	检测限
			Rev:CACGGCAACTGTCATGTATT		66 拷贝/反应
			Probe:ATGAACCTGAACACCTGAAGCCAATCTATG	水解探针模式检测	
	HCoV-OC43	M	For:CATACYCTGACGGTCACAATAATA		检测限
			Rev:ACCTTAGCAACAGTCATATAAGC		18 拷贝/反应
			Probe:TGCCCAAGAATAGCCAGTACCTAGT		
	HCoV-NL63	N	For:GTTCTGATAAGGCACCATATAGG		检测限
			Rev:TTTAGGAGGCAAATCAACACG		69 拷贝/反应
			Probe:CGCATACGCCAACGCTCTTGAACA		
	HCoV-HKU1	N	For:TCCTACTAYTCAAGAAGCTATCC		检测限
			Rev:AATGAACGATTATTGGGTCCAC		9 拷贝/反应
			Probe:TYCGCCTGGTACGATTTTGCCTCA		
Mackay，等 . 2012[48]	HCoV-229E	N	For:ACAACGTGGTCGTCAGGGT	单重一步法实时 RT-PCR，Rotor-Gene 3000/6000/Q	检测限
			Rev:GCAACCCAGACGACACCT		≤10 拷贝/反应
			Probe:CATCTTTATGGGGTCCTG (MGB)	水解探针模式检测	
	HCoV-OC43	N	For:GAAGGTCTGCTCCTAATTCCAGAT		
			Rev:TTTGGCAGTATGCTTAGTTACTT		
			Probe:TGCCAAGTTTTGCCAGAACAAGACTAGC		
	HCoV-NL63	N	For:GAGTTCGAGGATCGCTCTAATA		
			Rev:TGAATCCCCCATATTGTGATTAAA		
			Probe:AAAATGTTATTCAGTGCTTTGGTCCTCGTGA		
	HCoV-HKU1	ORF1b (Pol)	For:GTTGGGACGATATGTTACGTCATCTT		
			Rev:TGCTAGTACCACCAGGCTTAACATA		
			Probe:CAACCGCCACACATAA (MGB)		
Kuypers，等 . 2007[97]	HCoV-229E HCoV-OC43 HCoV-NL63 HCoV-HKU1	ORF1b (Pol)	F1:TGGTGGCTGGGACGATATGT	单重一步法实时 RT-PCR，	10 拷贝/反应
			F2:TTTATGGTGGTTGGAATAATATGTTG	水解探针模式检测	在通用和亚型特异性反应中
			F3:TGGCGGGTGGGATAATATGT	229E:F3/P2/R3	
			F-OC:CCTTATTAAAGATGTTGACAATCCTGTAC	NL63:F2/P1/R2	
			R1:GGCATAGCACGATCACACTTAGG	OC43&HKU1:F1/P1/R1	
			R2:GGCAAAGCTCTATCACATTTGG	OC43:F-OC/R-OC/P-OC	
			R3:GAGGGCATAGCTCTATCACACTTAGG		
			R-OC:AATACGTAGTAGGTTTGGCATAGCAC		
			P1:ATAATCCCAACCCATRAG		
			P2:ATAGTCCCATCCCATCAA		
			P-OC:CACACTTAGGATAGTCCCA		

（续 表）

文献	病毒	靶基因	核酸序列	检测方式	已报道的检测敏感性
Dare，等．2007[130]；van Elden，等．2004[135]	HCoV-229E	N	For:CAGTCAAATGGGCTGATGCA Rev:AAAGGGCTATAAAGAGAATAAGGTATTCT Probe:CCCTGACGACCACGTTGTGGTTCA	单重一步法实时 RT-PCR，iCycler iQ 水解探针模式检测	50 拷贝/反应，100%检测出 5 拷贝/反应，93%检测出
	HCoV-OC43	N	For:CGATGAGGCTATTCCGACTAGGT Rev:CCTTCCTGAGCCTTCAATATAGTAACC Probe:TCCGCCTGGCACGGTACTCCCT		50 拷贝/反应，100%检测出 5 拷贝/反应，33%检测出
	HCoV-NL63	N	For:GACCAAAGCACTGAATAACATTTTCC Rev:ACCTAATAAGCCTCTTTCTCAACCC Probe:AACACGCT"T"CCAACGAGGTTTCTTCAACTGAG[b]		50 拷贝/反应，100%检测出 5 拷贝/反应，80%检测出
	HCoV-HKU1	ORF1b (Pol)	For:CCTTGCGAATGAATGTGCT Rev:TTGCATCACCACTGCTAGTACCAC Probe:TGTGTGGCGGTTGCTATTATGTTAAGCCTG		50 拷贝/反应，100%检测出 5 拷贝/反应，33%检测出
Esposito，等．2006[174]	HCoV-229E	N	For:CGCAAGAATTCAGAACCAGAG Rev:GGGAGTCAGGTTCTTCAACAA Probe:CCACACTTCAATCAAAAGCTCCCAAATG	单重两步法实时 RT-PCR，ABI 7700/7500 水解探针模式检测	检测敏感性估计＜500～1000 拷贝/ml
	HCoV-OC43	N	For:GCTCAGGAAGGTCTGCTCC Rev:TCCTGCACTAGAGGCTCTGC Probe:TTCCAGATCTACTTCGCGCACATCC		
	HCoV-NL63	N	For:AGGACCTTAAATTCAGACAACGTTCT Rev:GATTACGTTTGCGATTACCAAGACT Probe:TAACAGTTTTAGCACCTTCCTTAGCAACCCAAACA		
	HCoV-HKU1	N	For:AGTTCCCATTGCTTTCGGAGTA Rev:CCGGCTGTGTCTATACCAATATCC Probe:CCCCTTCTGAAGCAA (MGB)		
Chan，等．2015[131]	HCoV-229E	5′UTR 前导序列	For:CTACAGATAGAAAAGTTGCTTT Rev:GGTCGTTTAGTTGAGAAAAGT Probe[c]:AGACT+T+TG+TG+TCT+A+CT	单重一步法实时 RT-PCR，LightCycler 96 锁核苷酸水解探针模式检测	检测限 10 RNA 拷贝/反应
	HCoV-OC43	5′UTR 前导序列	For:AAACGTGCGTGCATC Rev:AGATTACAAAAAGATCTAACAAGA Probe[c]:C+TTCA+CTG+ATCT+C+T+TGT		检测限 .10 RNA 拷贝/反应

（续 表）

文献	病毒	靶基因	核酸序列	检测方式	已报道的检测敏感性
	HCoV-NL63	5′UTR 前导序列	For:GGAGATAGAGAATTTTCTTATTTAGA Rev:GGTTTCGTTTAGTTGAGAAG Probe[c]:TGTGT+C+TAC+T+C+TTCT+CA		检测限 ·5 RNA拷贝/反应
	HCoV-HKU1	5′UTR 前导序列	For:CGTACCGTCTATCAGCT Rev:GTTTAGATTTAATGAGATCTGACA Probe[c]:ACGA+T+CT+C+TTG+T+CA		检测限 5 RNA拷贝/反应

注：[a] 其他 HCoV-HKU1 的 RT-PCR 检测方法见最近发表的综述[15]。For. 正向；Rev. 反向；Pol. 多聚酶；UTR. 非翻译区；MGB. 小沟结合探针。[b]内部 BHQ1 淬灭，用"T"表示。[c]字母+代表锁核苷酸碱基

表 92-2 当前上市的包含流行性 HCoVs 的商业化检测试剂盒[a]

生产商	产品	流行 HCoV 检测注册情况	方法	平台	流行性 HCoV 种类	其他目标病原体	批准用于检测的标本类型	检测时间
Genmark Dx	ePlex respiratory pathogen panel	CE-IVD, FDA	单检测盒内结合数字微流控提取、扩增和电化学检测	ePlex system (Genmark Dx)	229E, OC43, NL63, HKU1	AdV, hBoV, hMPV, RhV/EV, FA, FA H1, FA H1-2009, FA H3, FB, PIV 1/2/3/4, RSV A/B, MERS-CoV, Bordetella pertussis, Legionella pneumophila, Myco-plasma pneumoniae	NPS	约1.5 h，从标本到出结果
BioFire Diagnostics, bioMérieux[b]	FilmArray respiratory panel	CE-IVD, FDA, TGA	单检测袋内结合提取、多重PCR和终点熔解曲线分析	FilmArray multiplex PCR system	229E, OC43, NL63, HKU1	AdV, hMPV, RhV/EV, FA, FA H1, FA H1-2009, FA H3, FB, PIV 1/2/3/4, RSV, B. pertussis, Chlamydophila pneumoniae, M. pneumoniae	NPS	约1 h，从标本到出结果
	FilmArray RP2plus	CE-IVD				All above plus MERS-CoV, B. parapertussis	NPS	小于 45 min，从标本到出结果
Luminex Molecular Diagnostics	xTAG RVP Fast v2	CE-IVD	悬液微阵列多重PCR	Luminex100/200 or MAGPIX	229E, OC43, NL63, HKU1	FA, FA H1, FA H3, FA H1N1 2009[c], FB, RSV A/B, PIV 1/2/3/4, hMPV, hBoV, RhV/ EV, AdV	NPS, NPA, BAL	3 h，从核酸提取开始

（续 表）

生产商	产品	流行 HCoV 检测注册情况	方法	平台	流行性 HCoV 种类	其他目标病原体	批准用于检测的标本类型	检测时间
	NxTAG	CE-IVD,FDA		Luminex MAGPIX		All above plus M. pneumoniae, C. pneumoniae, L. pneumophila[d]	NPS	小于 3 h,从核酸提取开始
PathoFinder	RespiFinder 2SMART	CE-IVD	多重实时 PCR;熔解曲线分析	LightCycler 480 (Roche), Rotor-Gene Q(Qiagen)	229E, OC43, NL63, HKU1	FA, FB, FA (H1N1) pdm09, RSV A/B, hMPV, RhV/EV, AdV, PIV 1/2/3/4, hBoV, L. pneumophila, B. pertussis, M. pneumoniae, C. pneumoniae	未说明	2.5 h,从核酸提取开始
	RespiFinder 22	CE-IVD	多管多重终点法 PCR;片段大小	ABI 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems)	229E, OC43, NL63, HKU1	FA, FB, FA (H1N1) pdm09, RSV A/B, hMPV, RhV/EV, AdV, PIV 1/2/3/4, hBoV, L. pneumophila, B. pertussis, M. pneumoniae, C. pneumoniae	未说明	6 h,从核酸提取开始
	RealAccurate Quadruplex respiratory PCR	CE-IVD	多管多重实时 PCR	LightCycler 480 (Roche), Rotor-Gene Q(Qiagen)	229E, OC43, NL63, HKU1	FA, FB, FA (H1N1) pdm09, RSV A/B, hMPV A/B, RhV/ EV, AdV, PIV 1/2/3/4, hBoV, L. pneumophila, B. pertussis, M. pneumoniae, C. pneumoniae	NPS	2 h,从核酸提取开始
Fast-Track Diagnostics	FTD respiratory pathogens 33/21/21 plus	CE-IVD	多管多重实时 PCR	AB7500/7500 Fast (Life Technologies), Rotor-Gene3000/6000/Q (Qiagen), CFX96/DX with CFX software (Bio-Rad), Light-Cycler 480 (Roche), Smart-Cycler with Life Science software 2.0d (Cepheid)	229E, OC43, NL63, HKU1	FA, FA H1N1, FB, FC[e], RhV, PIV 1/2/3/4, hMPV A/B, hBoV, M. pneumoniae, RSV A/B, AdV, EV, PeV, C. pneumoniae[f], Staphylococcus aureus[f], Streptococcus pneumoniae[f], Haemophilusinfluenzae type B[f], H. influenzae[e], Pneumocystis jirovecii[e], Bordetella spp.[e], Moraxella catarrhalis[e], Klebsiella pneumoniae[e], L. pneumophila-L. longbeachae[e], Salmonella spp.[e]	咽/喉拭子,BAL,痰	未说明
Seegene	Seeplex RV15 ACE and RV15 one-step ACE	CE-IVD, Health Canada-IVD	多管多重终点法 PCR;片段大小	MultiNA (Shimadzu), Caliper LabChip Dx (Caliper Life Sciences)	229E/NL63, OC43	FA, FB, RSV A/B, hMPV, AdV, RhV A/B/C, EV, hBoV 1/2/3/4, PIV 1/2/3/4	NPS, NPA, BAL	未说明

（续 表）

生产商	产品	流行 HCoV 检测注册情况	方法	平台	流行性 HCoV 种类	其他目标病原体	批准用于检测的标本类型	检测时间
	Anyplex II RV16 detection	CE-IVD	多管多重实时 PCR：熔融曲线分析	CFX96 (Bio-Rad)	229E，NL63，OC43	FA，FB，RSV A/B，hMPV，AdV，RhV A/B/C，EV，hBoV 1/2/3/4，PIV 1/2/3/4	NPS，NPA，BAL	未说明
	Allplex respira-tory panel assay	CE-IVD	多管多重实时 PCR	CFX96 (Bio-Rad)	229E，NL63，OC43	FA，FA H1，FA H3，FA H1pdm09，FB，RSV A/B，hMPV，AdV，RhV A/B/C，EV，hBoV，PIV 1/2/3/4，M. pneumoniae，C. pneumoniae，L. pneumophila，B. pertussis，B. parapertussis，S. pneumoniae，H. influenzae	NPS，NPA，BAL	4.5 h，从核酸提取开始
AutoGenomics	Infiniti RVP Plus	CE-IVD	低密度微阵列	Infiniti Plus Analyzer	229E，OC43，NL63，HKU1	FA，FA swine H1N1，FB，PIV 1/2/3/4，RhV A/B，EV A/B/ C/D，hMPV A/B，RSV A/B，AdV A/B/C/E	NPA	未说明
Qiagen	RespiFinder RG panel	CE-IVD	多重实时 PCR：熔融曲线分析	Rotor-Gene Q（Qiagen）	229E，OC43，NL63，HKU1	FA，FA H1N1v，FB，RSV A/B，hMPV，AdV，RhV/ EV，hBoV，PIV 1/2/3/4，M. pneumoniae，C. pneumoniae，L. pneumophila，B. pertussis	NPS	未说明
Genomica	CLART PneumoVir 2	CE-IVD	多重 PCR、低密度微阵列检测	Clinical array reader (Genomica)	229E，OC43，NL63	AdV，hMPV A/B，PIV 1/2/3/4a/4b，RhV，RSV A/B，hBoV，EV，FA H1N1，FA H3N2，FA H1N1/2009，FA H7N9，FB，FC	NPW，NPS，BAL	1个工作日内

注：[a] FA. 甲型流感病毒；FB. 乙型流感病毒；FC. 丙型流感病毒；PIV. 副流感病毒；RSV. 呼吸道合胞病毒；AdV. 腺病毒；hMPV. 人偏肺病毒；RhV. 鼻病毒；hBoV. 人博卡病毒；EV. 肠病毒；PeV. 小 RNA 病毒；CMV. 巨细胞病毒；NPS. 鼻咽拭子；NPW. 鼻咽洗液；BAL. 支气管肺泡灌洗液。[b] 除美国外，BioFire RP2 检测 MERS-CoV 无限制；在美国，RP2Plus 检测 MERS-CoV 限制在 MERS-CoV 危险因素的人群中使用。[c] RVP Fast v2 only。[d] CE-IVD only。[e] FTD 33 only。[f] FTD 33 and 21 plus only

5. SARS-CoV 的检测 在病毒首次被发现后，以聚合酶基因（复制子 *ORFb* 基因）为靶点的、内部使用的实时和巢式 RT-PCR 方法都较快实现了 SARS-CoV 检测，同时合成序列为阳性质控以实现定量检测[33-34,36-37]。随后，出现一些以聚合酶和 *N* 蛋白基因为靶点的其他 NAATs，在检测敏感性上有所提高，尤其是在发病的第 1 周内[141]。也有关于采用等温 NAATs，如核酸序列依赖性扩增法（NASBA）和 LAMP 的报道[142]，与 RT-PCR 和血清学相比，此类商品化试剂具备不同的临床敏感性和特异性[143-144]。此外，"泛 CoV"检测也可以检测 SARS-CoV，但一线筛选更倾向于使用种特异性检测[145]。一篇详细描述 SARS-CoV 的 NAATs 检测方法的综述，其中包括一系列寡核苷酸序列和试剂性能的对比，已于 2005 年发表[143]。

6. MERS-CoV 检测 较快实现检测 MERS-CoV 的试剂是以包膜蛋白的上游基因（*upE*）为靶点内部使用的实时 PCR，同时包含阳性对照；以及敏感性稍低的以 *ORF1b* 基因为靶点的实时 PCR 作为替代试剂[146]。之后不久，基于 *ORF1a* 的实时 RT-PCR 试剂被研发出来，且比 *ORF1b* 具有更高敏感性[147]。2013 年 6 月，美国 FDA 批准了一个以 *N* 基因和 *upE* 基因为靶点的 rRT-PCR 试剂组合，作为 MERS-CoV 的体外诊断试剂[148]。从此后，若干内部使用的和商品化的 rRT-PCR 方法，以及等温扩增方法，检测 MERS-CoV 被报道，虽然各方法间比较性研究仍较局限[130,149-153]。目前，WHO 推荐通过 *upE* 检测进行潜在 MERS-CoV 病例的初步筛查，通过 *ORF1a*、*ORF1b*、*N* 基因检测进行确认[119]。如果上述检测均为阴性，可采用 N 蛋白或聚合酶基因的测序进行辅助确认[147]。

七、病毒分离操作

HCoVs 病毒分离是一种不高效的常规诊断工具，因为多数常用的细胞系要么不适合病毒生长，要么可能培养后不能表现出明显的细胞病变效应（cytopathic effect，CPE）。CPE 通常是非特异的，并且在培养中进行荧光检测的试剂也未得到广泛使用。有研究使用 RT-PCR 检测细胞培养上清中的 HCoV，但在常规工作中，利用 NAATs 直接检测标本病毒则更为高效。最初，人胚胎肾细胞被用来分离 HCoV-229E 病毒，随后在一系列人胚胎肺纤维细胞系（如 WI-28、L132 和 MRC-5）中实现了病毒的繁殖[29,66,90,125,135,154]。HCoV-OC43 病毒最早从人胚胎气管器官培养中分离出来[30]，随后这种病毒适应了在哺乳期小鼠脑器官，以及包括 HRT-18、RD 和 HEL 细胞系在内的细胞培养[125,134-135,155]。HCoV-NL63 最早是从第三代猴肾细胞中分离出来，接着在 Vero 和 LLC-MK2 猴肾上皮细胞系中繁殖[40]。一些报道介绍 HCoV-NL63 的 CPE 出现在接种的第 4 天或第 5 天（图 92-3），其他研究则发现低病毒滴度伴随着较慢出现的 CPE，且很难再维持生长[40,128,155-156]。HCoV-NL63 的生长在 CaCo-2 细胞系中更为高效，可以确保开展细胞病变空斑试验[155]。

上皮细胞传代细胞系 HuH7 可以用来进行 HCoV-229E、HCoV-OC43 和 HCoV-NL63 的培养[72,128,157]。然而，HCoV-HKU1 尚不能在任何常见细胞系中增殖[41]。近期，在原代人支气管上皮细胞中，成功实现了包括 HCoV-HKU1 在内的 4 种 HCoVs 的增殖[158-159]。在这个培养体系中，HCoV-NL63 依然难以分离，且任意一种病毒都不出现可见的 CPE。HCoV-HKU1 现在也已在原代人类Ⅱ型肺泡细胞中连续繁殖[160]。不同于其他 HCoVs，SARS-CoV 可以在 Vero 和恒河猴胚肾细胞中生长，2～6 天内出现局部 CPE，并快速蔓延至整个单层细胞层[33-34,37]。人细胞系如 HuH7、HEK-293 和 Hep-G2 也适于 SARS-CoV 感染[161]。MERS-CoV 最早从 LLC-MK2 和 Vero B4 细胞中分离出来[43]，然而，从 Caco-2 细胞中分离似乎更成功[162]。病毒也可以感染多种细胞系，包括灵长动物、猪和蝙蝠来源的细胞系。因为存在无意识地从细胞培养中分离到新型 CoV 的可能性，所以当怀疑 SARS-CoV、MERS-CoV 或其他新型 CoV 感染时，在不具备 BSL3 级设施和操作程序时，不可以尝试病毒分离。已有关于 SARS-CoV 意外传播给实验室工作人员的报道。

八、血清学试验

对于流行性 HCoVs 的诊断，血清学试验已基本被更加敏感和特异的 NAATs 所取代。血清学试验有助于流行病学研究，可以增强人们对于

HCoV 感染的理解，在病毒暴发时帮助人们进行研究。特别对于新发突发 HCoV 感染（如 SARS-CoV）的诊断非常重要。在这些情况下，尤其是疾病早期，感染者可能检测不到病毒 RNA，但回顾性调查可证实患者建立了免疫反应。在基于 ELISA 的血清学试验中，病毒裂解抗原的使用需要将 CoVs 繁殖到很高滴度，对于 HCoV-NL63 很难实现，若无原代培养，HCoV-HKU1 更不可能生长。此外，由于在 HCoVs 病毒中存在抗原近缘交叉，血清学试验缺少特异性，特别是对于阿尔法冠状病毒中的 HCoV-229E 和 HCoV-NL63 之间，以及贝塔冠状病毒中的 HCoV-OC43 和 HCoV-HKU1 之间。

病毒核衣壳蛋白 N 可以诱发良好的免疫反应，由于重组 N 蛋白可以稳定表达和纯化且不需病毒培养，因此在 ELISA 检测中广泛使用。据报道，使用全长或截短 N 蛋白的血清学试剂具有交叉反应性，特别是在同种 HCoVs 之间[68,71,163]。然而，N 蛋白 C 端区被认为在 HCoVs 之间具有显著低的同源性，利用此区域重组 N 蛋白已经成功开发出 ELISA 检测试剂，可以检测全部 4 种流行性 HCoV[51,68,71]，但这可能付出了一些敏感性的代价，因为近期发现 HCoV-OC43 的 N 蛋白 C 端区的免疫原性较中心区低[164]。基于重组 S 蛋白的 ELISAs 也可以用于检测 HCoV-HKU1[70]。一些 HCoVs 很难进行体外培养阻碍了中和试验的建立，但使用 HCoV-HKU1 和 HCoV-NL63 的 S 蛋白的准病毒（S-pseudotyped）中和试验可以克服这个问题[70,72]。

和其他 HCoVs 一样，大多数 SARS-CoV 的血清试剂是检测急性期和恢复期血清抗体，主要通过 2 种方法，一是使用固定了感染细胞的 IFA 检测，二是使用细胞培养裂解液的 ELISA 检测[34,36]。随后，为了规避 BSL3 的政策限制要求，又开发了基于重组 N 蛋白的 ELISAs 试剂，并使用 N 和 S 蛋白抗体进行免疫印迹法确认。中和试验需要进行 SARS-CoV 培养，因此常规诊断中极少应用。已报道有数种实验室内部使用和商品化的血清学试验检测 MERS-CoV，但是缺乏各个检测间直接的方法学比较，这些检测方法包括蛋白芯片、ELISA、基于全病毒或重组蛋白的 IFA、微量中和试验、蚀斑减少中和试验、S 蛋白的假病毒中和试验，假病毒中和试验的优点是无须使用活病毒[165]。但是，近期一项比较学研究显示多种不同的中和试验之间具有良好的相关性，包括准病毒（S-pseudotyped）中和试验和商品化的 S 抗原 ELISA 试验[166]。据最新的 WHO 的 MERS-CoV 指南，1 例患者在至少 1 个筛选试验（ELISA 或 IFA）中有血清学转化的证据，同时通过中和试验确认，发生血清学转化的样品最好是相隔至少 14 天采集的，可认定为确诊病例[119]。在筛选试验时与地方性 HCoVs 发生交叉反应的标本中，建议使用中和试验进一步确认。

九、结果的评价、解释和报告

由于症状与其他呼吸道病原体引起的疾病相似，感染病例的快速诊断是所有 HCoV 感染诊治的基石。精准、及时的诊断有助于病毒监测，适当的感染控制和公共卫生程序并通过提供病毒诊断帮助进行抗菌药物管理。除此之外，需及时开发和验证 HCoV 诊断检测方法，从而产生实验室和最终用户均认可的测试结果。目前，关于 NAATs 方法的建立和验证已有全面的指导[167-168]，引入内部和外部质量控制（IQA 和 EQA）程序是十分必要的。利用分子诊断质控 EQA 组合评估发现，不同实验室之间使用 NAATs 检测 HCoV 的能力不同[169-170]。EQA 确保其他实验室之间进行能力比较，并发现敏感性和特异性方面的问题。这对于 NAATs 检测尤其重要，因为这种方法面临诸多具体挑战，如病毒基因组持续的序列变异、反应抑制和潜在污染。根据新的序列信息，应对 NAATs 检测新的 CoV 变种的能力进行频繁的评估。此外，在样本提取阶段加入内部质控（这种质控与病毒 RNA 共同提取，并且与 HCoV 目标基因一同进行 NAAT 检测），对于发现 RT-PCR 抑制是必要的。最后，在进行分子扩增试验时，良好的实验室操作规程十分重要，读者需对这个问题予以关注[168,171]。

对于样本采集、处理、检测和报告，特别是新发突发 HCoVs（如 SARS-CoV 和 MERS-CoV），遵循国家或国际认可的操作规程是非常重要的，还包括在指定参比实验室进行阳性诊断结果的确认，以及公共卫生专家的参与[119]。在这点上，结果解释和报告的错误会造成明显的负面结果。就像对 SARS-CoV 出现时的快速反应一样，国际实

验室诊断协会对近期的 MERS-CoV 同样反应迅速。在通知出现第一例 MERS-CoV 后的短短几天内，通过国际协作的努力，开发出了有效的 NAATs 试剂，后者在很多专业实验室中被广泛使用[172]。尽管突发 CoVs 检测的标准化和质量控制十分重要，并且在后面的铺开检测中要得到充分管理，这依然是国际实验室协作网络效率的关键环节[173]。在这些情况下，由于法规审批流程，造成商业试剂开发的滞后，也显示出了在病毒诊断实验室中保持内部分子诊断能力的重要性。鉴于 CoV 在哺乳动物和鸟类中的广泛存在，且有发生跨物种传播的风险，必须警惕未来可能出现的更多的人致病性 CoVs。

综上所述，在 ARI 患者感染的病毒中，4 种流行性 HCoVs 构成了虽小但很重要的一部分。在诊断筛选组合中纳入 HCoVs 和更常见的呼吸道病毒，如流感病毒、呼吸道合胞病毒和腺病毒，特别是在儿童中，将提高 ARI 的诊断检出率，并帮助人们进一步地研究 HCoVs 在呼吸道感染中的地位。

参考文献请扫二维码查阅

第93章　甲型与戊型肝炎病毒

JACQUES IZOPET，NASSIM KAMAR

（杨晓莉　译；王大燕、汤一苇　审校）

一、分类

（一）甲型肝炎病毒

甲型肝炎病毒（hepatitis A virus，HAV）属于小RNA病毒科嗜肝病毒属的一个种型，具有嗜肝性、较高的热稳定性及独特的病毒颗粒组装过程等特点。甲型肝炎病毒有和小核糖核酸样病毒[双顺反子病毒（dicistroviruses）]一致的原始衣壳，能感染昆虫[1]。随着时间或地点的变化，甲型肝炎病毒株在核苷酸序列上的变异不大。有6个密切相关的基因型（Ⅰ～Ⅵ型），但只有1个血清型[2]。其中，基因Ⅰ～Ⅲ型又进一步分为亚基因型A和B，与感染人类有关；基因Ⅳ～Ⅵ型则起源于猿猴。在小型哺乳动物如蝙蝠、啮齿动物、刺猬和鼩鼱身上也发现了其进化上的祖先形式[3]。

（二）戊型肝炎病毒

戊型肝炎病毒（hepatitis E virus，HEV）属于戊型肝炎病毒科（Hepevirdae family）[4]，该科病毒又分为2个属和5个种，其中2个属为正戊肝病毒属（Orthohepevirus）和鱼戊肝病毒属（Piscihepevirus）。正戊肝病毒属A种主要感染人类和其他哺乳动物。其他种则不感染人类：正戊肝病毒属B种主要感染禽类，C种主要感染鼠和雪貂，D种主要感染蝙蝠，鱼戊肝病毒属A种主要感染鲑鱼。正戊肝病毒属A种包含了至少7个不同的HEV基因型[4]，但只有1个血清型。基因1型和2型仅感染人类，主要分布在发展中国家[5]，是疾病流行的主要地区。基因3型和基因4型具有动物宿主（主要是猪），人感染病例分布在发达国家。目前已在相当数量的动物中检测到HEV基因3型和4型，如家猪、野猪、鹿、兔子和猫鼬[5]。在日本的野猪中检测到HEV基因5型和6型[6]，但在人类中尚未检测到。最近在骆驼中发现了HEV基因7型，这也是经常食用骆驼奶和骆驼肉的1例免疫抑制患者出现严重戊肝病毒感染的原因[7]。

二、病毒的描述

（一）甲型肝炎病毒

HAV是小RNA病毒，核衣壳为20面体立体对称。有2种形式的感染性颗粒。其中一种是由Feinstone[8]首先发现，该颗粒无包膜并从粪便中排出；直径约为27 nm，碘克沙醇梯度离心密度为1.22 g/cm^3。第二种是在血液循环中的病毒颗粒，隐匿在宿主细胞膜中；大小为50～110 nm，密度为1.08 g/cm^3[9]。通过定量蛋白质组学分析的方法已经确定了该HAV膜的蛋白组成[10]。包膜在保护HAV抵抗中和抗体的同时，也促进了浆细胞样树突状细胞对机体HAV感染的早期监测，但作用有限[11]。这可能也解释了在急性HAV感染早期观察到的极小的Ⅰ型干扰素反应[12]。HAV耐酸（pH<3.0），热稳定性强。加热（85℃）水和食物至少1 min才能使HAV失活[13]。

HAV基因组为单正链RNA，全长约7.5 kb（图93-1）。其由无帽子结构的5′末端非编码区（包括一个内部核糖体进入位点结构）、一个长的可读框[ORF，编码具有3个区段（P1、P2和P3）的2227个氨基酸的多肽]及一个非编码poly A尾。

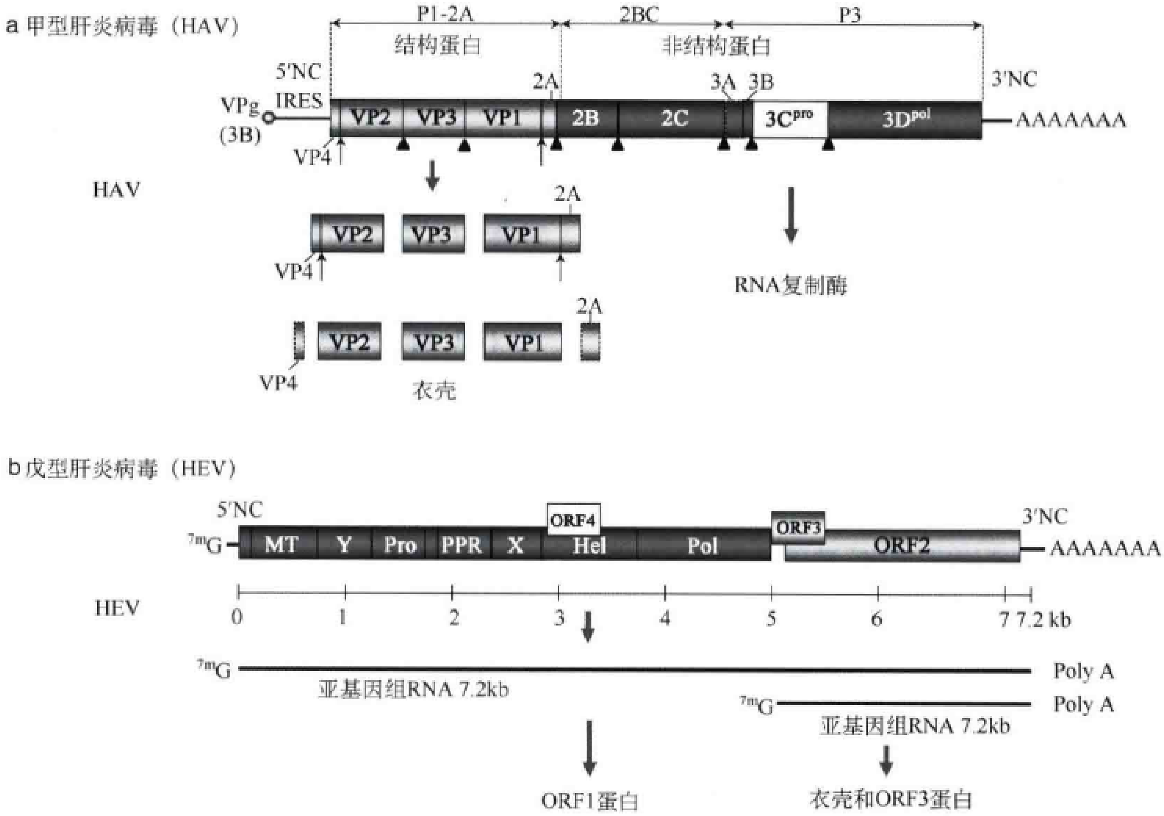


图 93-1　甲型肝炎病毒（HAV）和戊型肝炎病毒（HEV）的基因组结构。a. HAV：RNA 基因组 5′末端有一个内部核糖体进入位点（internal ribosome entry site，IRES）和 3′末端多聚腺苷酸。HAV RNA 基因组有一个单独的可读框（open reading frame，ORF）通过病毒蛋白酶 $3C^{pro}$（图示黑三角）编码多聚蛋白。b. HEV：RNA 基因组 5′端含有 7-甲基鸟苷帽和 3′末端多聚腺苷酸尾。ORF1 编码非结构蛋白，包括甲基转移酶（MT）、半胱氨酸蛋白酶（P）、多聚脯氨酸区域（PPR）、X 结构宏域（macrodomain）、解旋酶（Hel）和 RNA 聚合酶（Pol）。ORF2 和 ORF3 从双顺反子亚基因组 RNA 编码结构蛋白。ORF4（基因 1 型）与真核生物延伸因子 1（isoform 1）相互作用。NC. 非编码区。见彩插

大的多聚蛋白可被切割加工成 10 种成熟的蛋白质（图 93-1）。P1 片段编码病毒衣壳的 4 种结构蛋白为 VP1、VP2、VP3 和 VP4。其中，VP1 是最大的衣壳蛋白，在无包膜 HAV 中长度为 274 个氨基酸残基，在有包膜 HAV 中还有一个 8 kDa 的羧基端延伸（pX，也称为 2A，长度为 71 个氨基酸残基）[9]。pX 在衣壳组装和 HAV 包膜过程中起关键作用，但在膜丢失后被宿主蛋白酶从 VP1 中裂解。VP2 包含一个 YPX3L 晚期结构域，该结构域与 Alix 和血管蛋白分选同源物 4B（vascular protein sorting 4 homolog B，VPS-4B）结合，是运输所需的细胞内体分选复合物的组成部分[9]。VP4 是一种在小核糖核酸病毒装配过程中缺少末端豆蔻酰化信号的小多肽，它对病毒颗粒的形成至关重要，但在成熟颗粒中并不存在。HAV 衣壳为 12 个五聚体，是由 VP1、VP2 和 VP3 3 种主要蛋白各 60 个拷贝组成的。其余的多聚蛋白（P2 和 P3 片段）编码与 HAV RNA 复制有关的非结构蛋白：2B、2C、3A、3B（病毒基因组连接蛋白 VPg，与 HAV 基因组的 5′端共价结合）、$3C^{pro}$（半胱氨酸蛋白酶，负责翻译后剪切加工）和 $3D^{pol}$（依赖 RNA 的 RNA 聚合酶）。

以黑猩猩为代表的非人类灵长类动物，曾经被用来研究甲型病毒性肝炎的发病机制。目前，已有成功建立甲型肝炎的小鼠动物模型，能体现人类感染 HAV 的许多特征[14]。

（二）戊型肝炎病毒

HEV 是具有 20 面体衣壳的小 RNA 病毒。与 HAV 一样，HEV 也有 2 种形式的感染颗粒：无包膜颗粒和包膜颗粒。无包膜病毒颗粒是由 Balayan[15] 首次在粪便中分离鉴定的，直径为 27～34 nm，密度为 1.22 g/cm³。在血液循环中的病毒颗粒隐藏在宿主细胞膜中，大小为 50～

110 nm，密度 1.08 g/cm^3[16-18]。HEV 耐酸（pH＜3.0），在内部温度为 71℃ 的条件下至少煮 20 min 才能使 HEV 失活[19,20]。

HEV 为单正链 RNA 病毒，基因组全长约 7.2 kb（图 93-1）。由 1 个短的 5′末端非编码区（含有 7-甲基鸟苷帽）、3 个可读框（ORF1、ORF 2、ORF 3）和 3′末端非编码区（带有 poly A 尾）。

ORF1 编码与 HEV RNA 复制有关的非结构蛋白，长度约 1700 个氨基酸。该蛋白包括几个功能域：甲基转移酶/鸟苷转移酶、半胱氨酸蛋白酶、X 结构宏域、具有 5-核苷三磷酸酶活性的 RNA 解旋酶和 RNA 依赖的 RNA 聚合酶[21]。编码富含脯氨酸铰链的可变区（即多聚脯氨酸区域），是一个内在无序的区域，在这个区域内已经发现了人类基因片段[22-27]。有免疫缺陷的慢性感染患者在戊肝病毒准种（quasispecies）感染的急性期，在多脯氨酸区域有高度异质性的混合物[23]。HEV-1 在 ORF1 内还有一小段可读框 ORF4[28]。ORF4 在内质网应激后表达，与真核生物延伸因子 1 异构体 1 相互作用，从而刺激病毒聚合酶活性。

ORF2 编码有 660 个氨基酸的病毒衣壳蛋白。该蛋白有 3 个糖基化位点（Asn-132、Asn-310 和 Asn-562）并载有一个 N-端信号肽，通过信号肽识别蛋白进入内质网[29]。衣壳蛋白分为壳（shell，S）、中部（middle，M）和刺突（protruding，P）3 个结构域。P 结构域是中和抗体的主要靶目标，并包含一个未知的受体结合区域[30-31]。衣壳单体自我组装形成同源二聚体，而后封装病毒 RNA 形成十聚体。衣壳由 180 个拷贝组成，呈 T＝3 的二十面体对称结构[32]。对衣壳蛋白免疫学和结构的研究有助于戊型肝炎疫苗的研发[33]。有免疫缺陷的慢性戊型肝炎患者感染戊型肝炎准种，其基因组在衣壳蛋白 M 和 P 区域编码具有高度异质性[34]。

ORF3 编码一种对病毒释放至关重要的小蛋白质（HEV 基因 3 型 113 个残基和 HEV 基因 1 型、2 型及 4 型 114 个残基）。ORF3 蛋白仅与包膜型 HEV 颗粒相关，与无包膜 HEV 颗粒无关。ORF3 蛋白必须在 Ser80 上磷酸化，才能与衣壳蛋白的非糖基化形式相互作用[35]。ORF3 蛋白包含一个保守的脯氨酸-丝氨酸-丙氨酸-脯氨酸序列，使其能够与运输所需的内体分选复合物相互作用，包括肿瘤易感基因 101（Tsg 101）[36-41]。

以黑猩猩和猕猴为代表的非人类灵长类动物，被不同的团队用来研究 HEV 的发病机制。现已建立以免疫抑制药物处理的猴子或猪[42-43]或人肝嵌合子小鼠[44-47]的新模型去研究慢性戊肝病毒感染。

三、流行病学和传播

HAV 和 HEV 主要通过粪-口途径传播。虽然传播方式可能非常相似，但 HAV 和 HEV 的流行病学不相同。

（一）传播

1. 甲型肝炎病毒 甲型肝炎具有高度的传染性，暴发的发生也经常被报道，特别是在发达国家，人群的群体免疫力较低。尚未发现人类甲型肝炎病毒株的动物宿主。

（1）水源和食物传播：食用被污染的食物或水是感染甲型肝炎的主要方式。在被邻近的化粪池系统或污水污染的水体中游泳是另一种方式。许多食物都与甲型肝炎的暴发有关。食品的污染可能发生在加工、收获、准备或供应的各个环节。海鲜、蔬菜和水果是典型的传播媒介[48]。据报道，1988 年在中国上海因生食毛蚶而暴发了最大规模的甲型肝炎流行，约有 30 万人感染[49]。甲型肝炎经污染的食品和水源传播而引起暴发流行，在地方性程度较低或中等的工业化国家仍然是一个公共卫生问题。

（2）人与人之间传播：在发展中国家和发达国家，感染者和易感人群之间的密切接触是甲型肝炎最常见的传播方式。无症状感染者（特别是幼儿）及在症状出现前后粪便中甲型肝炎病毒的长时间排毒，都可促进传播。这种获得 HAV 的方式经常发生在学校、托儿所和日托中心等密集的机构中[50]。

（3）其他传播方式：HAV 感染的暴发流行经常发生在有男-男性行为的男性中[51]。HAV 不是通过精液传播，而是通过口腔接触粪便污染部位传播。最初将甲型肝炎病毒引入男性同性恋群体后，传播变异迅速扩散并持续了很长一段时间[51]。

在注射吸毒者中也有 HAV 暴发流行的报道[52]。

最后,HAV可偶尔通过输血或血液制品传播[53]。在某些情况下,受检者抗HAV-IgG阳性[53]。因为献血者之间的甲型肝炎急性感染为偶发性,而且缺乏慢性携带者,因此不建议对献血者进行甲型肝炎筛查。同时,血浆行业可将所有来源的血浆每份取少量混合在一起进行HAV核酸检测。

2. 戊型肝炎病毒 HEV基因1型和2型的传播方式不同于基因3型和4型。在发展中国家常见HEV基因1型和2型的感染,导致多达25%的孕妇因重型肝炎死亡[5]。饮用被污染的水是主要传播途径。暴发流行通常与饮用水供应被粪便污染有关[54]。在水卫生和卫生设施有限的难民营中也发生过疫情[55-56]。在HEV的传播中,人与人之间的传播少见[57-58]。有充分的依据表明HEV可从受感染的妇女垂直传播给新生儿[59-60],并且已经有关于通过输血传播HEV基因1型的报道[61-62]。

HEV基因3型和4型主要分布在发达和收入高的国家。由于HEV基因3型和4型的传染源是动物,因此,主要传播途径是食用被HEV感染的动物产品,尤其是未煮熟的肉类。食用受感染的猪肝、含有猪肝的猪肉制品和其他生吃或未煮熟的猪肉被确定为戊肝病毒感染的主要来源[63-65]。食用受感染的野味是另一种人类感染方式。在人体内检测到兔戊肝病毒株[66-67]。此外,在中国农村的黄牛[68]和牛奶[69]中也发现了戊肝病毒。感染动物的戊肝病毒排毒会污染水源,导致戊肝病毒在水果、蔬菜和贝类中积累。因此,曾在红色水果、草莓、沙拉和香料[70]及牡蛎和蚌类[71]中检测到HEV RNA(HEV基因3型)。最近,许多国家和地区,如欧洲部分国家[72],以及中国[73]和日本[74]等有研究表明,HEV能够通过输入血制品传播。大多数输血传播的戊型肝炎感染为无症状,只有一小部分感染HEV的输血者会出现肝炎症状。在献血者中,许多国家HEV RNA阳性的比例为1∶14 799至1∶600[75]。部分发达国家已根据HEV流行病学采取措施提高血液安全[76]。爱尔兰(自2016年起)、英国和荷兰(均自2017年起)对所有献血者进行筛查。法国自2013年以来,对于有严重疾病风险的输血患者,需对供者血浆进行选择性筛查[77-78]。

(二)流行病学

1. 甲型肝炎病毒 甲型肝炎病毒呈全球分布。然而,根据卫生水平和社会经济状况的不同,HAV的流行病学特征在人群之间也存在差异。有学者根据不同年龄段的人群中50%血清阳性率,提出了一种甲型肝炎地方性分类:非常高(<5岁)、高(5~14岁)、中等(15~34岁)和低(≥35岁)[79](图93-2,请见原书1628页)。

(1)高-地方性流行模式(high-endemicity pattern):资源匮乏的国家往往公共卫生条件较差,如非洲大多数地区和亚洲部分地区,甲型肝炎的传播率非常高,而且该病是在儿童早期获得。由于感染者无症状,这也使其在随后的生活中能够普遍预防甲型肝炎。大多数人在5岁之前就已经暴露于HAV,并且血清学反应呈阳性。

(2)低-地方性流行模式(low-endemicity pattern):各种资源丰富的国家有良好的公共卫生条件(如北美国家、欧洲国家,以及澳大利亚、日本等),甲型肝炎的流行很少,所有年龄阶段的人群对HAV普遍易感。由于队列效应,老年组的血清HAV感染率更高。在这些国家中,任何甲型肝炎在人群中的出现都可能引起传播流行且疾病带有黄疸等症状,例如,在男同性恋者中或通过食用被污染的食品。

(3)中-地方性流行模式(intermediate-endemicity pattern):在资源中等的国家(如北非、南美、亚洲西部等),HAV传播相当迅速,5岁以上儿童和年轻人即可出现症状。在这些国家,社会经济的发展和卫生条件的改善导致了流行病学的转变,其特征是尽管甲型肝炎的传播率降低,甲型肝炎的发病率、住院率和死亡率增加[80]。这一公共卫生问题已使常规HAV疫苗接种引入儿童预防策略中[81-82]。

2. 戊型肝炎病毒

(1)HEV基因1型和2型:HEV基因1型流行区域主要在南亚、中亚、东南亚及非洲和中东并具有高度的地方性[5](图93-2)。HEV基因2型流行区域主要在西非和墨西哥。近几十年来在中国,导致该病频繁暴发的HEV基因1型患病率在下降,而HEV基因4型患病率上升。这可能与卫生条件的改善和收入的增加有关。据统计,亚洲和非洲每年有2010万新感染病例

(95% CI 280万～3700万)[83]。由于不同的血清学试验方法，其敏感性也不同，因此，很难确定这些地区的血清真阳性率。然而，有关报道的数据显示，亚洲和非洲大部分地区的抗HEV抗体率为10%～40%[84]，大多数病例为青少年和青壮年[5]。与成人相比，无症状感染更容易发生在儿童中。

(2)人畜共患基因型：HEV基因3型主要分布在欧洲、北美和南美，而基因4型主要在亚洲[85]。在欧洲，HEV基因4型以散发病例为主，而基因1型与旅行有关。同样，由于血清学试验方法敏感性的差异，不容易得到血清真阳性率。尽管在不同地区有所不同，但似乎都存在很高的阳性率，如法国西南部52%[86]、德国年龄在60岁以上者超过40%[87]，以及英国、比荷卢三国和德国10%～20%[85]。在美国，有历史数据显示，血清中抗-HEV IgG的阳性率为21%，而最新数据显示血清阳性率仅为6%。美国政府可获得的数据很少，也可能与缺乏FDA批准的抗HEV血清学试验方法有关。

四、临床意义

临床表现与病程

由于临床特征或病理检查不能区分各种肝炎病毒感染造成的急性肝炎。因此，实验室检查是诊断的关键。

1. 甲型肝炎病毒 HAV感染的临床表现多种多样。许多感染者，尤其是5岁以下的儿童不表现临床症状。有症状的HAV感染包括轻度无黄疸型肝炎、急性黄疸型肝炎和急性肝功能衰竭。急性甲型肝炎可病程延长或伴有复发，但不发生慢性化。

典型的急性甲型肝炎感染初始于有临床表现，疾病潜伏期约为4周(2～6周)，会出现不适、呕吐、厌食、发热和右上腹疼痛的前驱症状。超过70%的老年患者会出现严重的发热、不适、食欲不振和黄疸。通常可见深色尿和脱色便(decolored stools)。可见肝肿大和脾肿大。感染高峰出现在最初症状前2周或至少1周后。急性型疾病持续时间不超过2个月，平均为2周。甲型肝炎可引起急性肝衰竭，导致凝血功能障碍和肝性脑病。死亡的风险随着年龄和潜在的肝脏疾病如慢性乙型或丙型肝炎而增加。总的来说，甲型肝炎的病死率为0.3%，从15岁以下儿童的0.1%到50岁以上成人的3%不等。急性甲型肝炎感染患者很少发生心包炎、肾功能衰竭、血小板减少、贫血、吉兰-巴雷综合征(Guillain-Barré syndrome)和血管炎/关节炎[89]。

2. 戊型肝炎病毒 在大多数病例中，无论何种HEV基因型，急性感染都是无临床症状的。急性戊型肝炎的临床表现与所有急性肝炎相似。在早期阶段，非特异性症状如不适、发热、身体疼痛、恶心和呕吐。随后出现深色尿和黄疸。急性期肝酶水平升高，在症状消失后恢复到正常范围。潜伏期通常为2～6周，随后出现IgM反应，大约在血清丙氨酸氨基转移酶(alanine aminotransferase, ALT)水平升高并持续6～9个月时可以检测到[90]。IgG反应滞后，尽管它的确切持续时间仍不确定，但能持续数年。在潜伏期，HEV RNA可在血液和粪便中检测到，并分别持续约4周和6周。衣壳抗原在血液中停留的时间大致相同[91]。

慢性肝病(急性或慢性肝炎)患者感染基因1型或3型[92-93]和孕妇感染基因1型[94-95]均易发生暴发性肝炎。在上述孕妇感染患者中可能导致高达15%～25%的死亡率。在感染基因3型或4型的孕妇中未发现暴发性肝炎病例[94-95]。感染基因3型或4型的慢性肝炎只发生在有免疫抑制患者中。目前尚无感染基因1型和2型后出现戊型肝炎慢性化的报道。在实体器官移植患者[96-98]、干细胞移植患者[99-100]、艾滋病病毒阳性患者[101]和接受化疗[102]或免疫疗法[103]的患者，因为机体几乎不可能自动清除戊肝病毒，并且戊肝病毒复制可以持续超过3或6个月，进一步导致伴有进展性肝纤维化和肝硬化的慢性肝炎[96,104]。HEV感染后，有1/3的实体器官移植患者机体会自动清除病毒，其余2/3患者则发展为慢性肝炎[98,105]。此外，有近10%的感染患者在感染后几年内发展为肝硬化[98,106]。机体深度免疫抑制状态和低特异性T细胞反应与慢性肝炎的演变有关[98,107]。大多数免疫抑制患者无症状，表现为轻度和持续性肝功能检测异常[98]。

除了肝内表现外，戊肝病毒感染还可引起肝外表现。免疫功能及免疫抑制患者若合并感染HEV基因1型和3型可出现神经系统的表现[108-110]。与HEV感染相关的最常见的神经病

学表现是吉兰-巴雷综合征[111-114]和神经痛性肌肉萎缩症[115,116]。在有神经症状患者的脑脊液中检测到 HEV RNA[109,117]。在感染 HEV 基因 1 型或 3 型的免疫抑制患者[118-121]中，也观察到肾损伤如膜性增生性肾小球肾炎伴或不伴冷球蛋白血症和膜性肾小球肾炎。其他 HEV 感染相关的肝外表现有：胰腺炎（仅与基因 1 型有关）、血液疾病、心肌炎、甲状腺炎、过敏性紫癜（henoch-schönlein purpura）和重症肌无力。

五、疫苗和抗病毒药物

（一）甲型肝炎病毒

通过主动或被动免疫可有效预防甲型肝炎病毒感染。注射人丙种球蛋白进行被动免疫可用于暴露后预防（暴露时间在 2 周内），尤其是免疫抑制患者、有高危严重疾病患者及 1 岁以内的婴幼儿。对于 12～40 岁人群，暴露于 HAV 后预防首选单剂甲型肝炎疫苗[122]。甲肝疫苗取代丙种球蛋白用于暴露前预防。

灭活的甲型肝炎疫苗含有在细胞培养中产生的病毒颗粒，经纯化后用福尔马林灭活并吸附到氢氧化铝上。除了甲型肝炎单疫苗外，还包括甲型肝炎-伤寒疫苗和甲型肝炎-乙型肝炎疫苗在内的联合疫苗已获批准。联合疫苗的免疫原性与单甲型肝炎疫苗相当。目前，中国已有减毒活疫苗。一般建议幼儿在 12 个月以后开始接种灭活疫苗，两剂间隔在 6～12 个月。近 95%的疫苗发挥了保护作用，保护时间至少可持续 10 年。建模研究预测，在接种疫苗之前血清学阴性的个体中，88%的个体保护时间将至少为 30 年[123]。

关于甲型肝炎疫苗接种需要的最佳策略是基于血清效价。对于发病率高的国家，通常不推荐接种疫苗。对于中等地方性流行国家，对所有儿童接种疫苗，可能保护青少年和青年成人的健康。在阿根廷，对 12 个月大的儿童进行一次单剂量灭活甲型肝炎疫苗，显著降低了有症状的甲型肝炎、重型肝炎和肝移植的发病率[81-82]。对于低地方性流行国家，一般建议对高危人群（到高地方性流行地区的旅行者、男性同性恋者、注射吸毒者、免疫抑制患者、艾滋病病毒感染者和慢性肝病患者）进行有针对性的免疫接种，但有时也可选择向一般人群推广。在美国，自 1999 年开始针对高危人群和生活在高发病率社区的儿童接种甲型肝炎疫苗。2006 年，美国疾病控制与预防中心（the Centers for Disease Control and Prevention，CDC）建议每个儿童应在 12～23 个月之间接种疫苗。甲型肝炎合并急性肝衰竭患者可以用 N-乙酰半胱氨酸治疗。在这种情况下，最严重的的患者往往需要肝移植。

（二）戊型肝炎病毒

已经研发出 2 种针对戊型肝炎的疫苗：56 kDa 亚单位抗原（昆虫细胞培养内表达的 ORF2 中第 112～607 位氨基酸）[124]和亚抗原 HEV 239（大肠埃希菌内表达的 ORF2 中第 368～606 位氨基酸）[125]。然而，目前只有 HEV 239 被批准用于人体[125-126]，而且只在中国被批准[125]。Hecolin 疫苗对基因 1 型和 4 型均表现出交叉保护作用，并用于诱导所有 HEV 基因型的保护性抗体[126]。该三剂疫苗显示了在预防症状性急性肝炎发作的有效性为 97%[125]，并在进一步的随访中显示了长期有效性[126]。建模研究表明，该保护作用可以在接种疫苗后持续 30 年[127]。疫苗似乎对孕妇是安全的[128]。然而，其安全性和有效性尚未在慢性肝炎患者或免疫抑制患者中进行验证。

有慢性肝炎的器官移植患者中，首选的治疗方法是减少免疫抑制，这也使得 1/3 的患者可以清除 HEV[98]。其余患者使用利巴韦林治疗戊肝病毒感染被证明有效[129-130]。在利巴韦林治疗 3 个月后，78% 的患者获得了持续的病毒学应答[130]。戊型肝炎复发的患者中可以用 6 个月治疗时间代替 3 个月来清除体内病毒[130]。在治疗结束时，持续性的戊肝病毒粪便脱落与治疗结束后戊肝病毒复发有关[131]。利巴韦林用于治疗 HEV 感染的干细胞移植患者也被证明是有效的[132]。另有研究表明，利巴韦林通过消耗鸟苷三磷酸池来抑制 HEV 的复制[133]。深度测序已经鉴定出几种 HEV RNA 突变，如 G1634R。最近的研究表明，利巴韦林增加 HEV 异质性，这似乎是可逆的[134-137]。然而，HEV RNA 变异的作用及其对 HEV 治疗结果的影响尚不确定[134-135]。聚乙二醇干扰素也成功地用于肝移植患者戊肝病毒感染的治疗[138-139]。但是，它不能用于其他器官移植患者，因为增加了急性排斥反应的风险[140]。目前尚无利巴韦林或聚乙二醇化干扰素的替代抗病毒

药物，也没有可靠的数据支持推荐利巴韦林在急性 HEV 感染阶段的使用。

六、样本的收集、运输及储存

采用标准方法进行血清或血浆的收集、运输及储存。用于检测 HAV 和 HEV IgM 和 IgG 抗体的血清可在 4℃保存数周，但长期保存需冷冻（－20℃或－70℃）。采血后，在 6 h 内离心 EDTA 抗凝管中的血液，所得血浆可立即用于检测 HAV RNA 或（和）HEV RNA 或－70℃冻存。可在无菌容器收集的粪便中检测出 HAV RNA 和 HEV RNA。在磷酸盐缓冲液中稀释和过滤后，立即对标本进行检测或－70℃保存。

七、直接检测

（一）电子显微镜检测

电子显微镜在鉴别 HAV[8] 和 HEV[15] 方面的作用具有历史价值。近年来，电子显微镜技术在鉴定包膜型 HAV 和 HEV（外泌体样颗粒）方面也很有用[9,18]。但电子显微镜检测敏感性低，且需要特殊的技术技能，因此没有诊断价值。

（二）抗原检测

1. 甲型肝炎病毒 用免疫测定法可在血液或粪便中检测到 HAV 抗原，但其敏感性低于核酸测定法。目前，尚无商品化的甲型肝炎抗原检测试剂。

2. 戊型肝炎病毒 检测 HEV 衣壳抗原可用于诊断 HEV 感染。目前，已建立一种固相抗体夹心酶联免疫吸附法，用包被有抗 HEV 抗体的微孔检测病毒衣壳蛋白。商品化的免疫测定法试剂（中国万泰生物制药有限公司）的敏感性为 91%（免疫正常者为 88%，免疫缺陷者为 94%）[141]。其特异性非常好（100%不受 EB 病毒、巨细胞病毒或丙型肝炎病毒感染的干扰），但使用连续稀释的 HEV RNA 阴性的抗 HEV 抗体阴性血浆检测，HEV RNA 的最低检测浓度为 800～80 000 U/ml[141]。对于没有分子诊断设备的实验室，该检验方法可作为直接诊断戊型肝炎病毒感染的替代方法。

（三）核酸检测

1. 甲型肝炎病毒 在丙氨酸氨基转移酶水平升高和临床疾病发生之前，可以通过实时 PCR（RT-PCR）检测血液和粪便中的 HAV RNA[53]。HAV RNA 检测对于极早期（窗口期）感染非常有用，尤其是作为血浆行业的一种安全措施；在 IgM 结果可疑的情况下，确定 HAV 感染也非常有用。已商品化的测试方法见表 93-1，目前检出限为 1～46 U/ml。实验室研发的测试必须仔细验证[142]。化学发光光纤基因传感器和小型化装置正在研发中[143]。

表 93-1 商品化 HAV RNA 和 HEV RNA 定量检测

病毒	制造商	产品名称	设备	分析敏感性	检测类型^{a}
甲型肝炎病毒（HAV）	Altona Diagnostics	Real Star HAV RT-PCR	m2000rt（雅培诊断） Mx3005P QPCR System (Stratagene) Versant kPCR Molecular System AD（西门子） ABI Prism 7500 SDS (Applied Biosystems) Rotor-Gene 6000 (Corbett Research) Rotor-Gene Q5/6 plex Platform (QIAGEN) CFX96 Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad) LightCycler 480 Instrument Ⅱ（罗氏）	46 U/ml	体外诊断 实时 PCR 定性试验 CE 标志

（续　表）

病毒	制造商	产品名称	设备	分析敏感性	检测类型[a]
	Hologic/Grifols	Procleix Parvo/HAV	Tigris，Panther	1 U/ml	输血，TMA 可同时检测 HAV 和细小病毒 B19
	Roche(罗氏)	COBASTaq ScreenDPX	COBAS s201	1 U/ml	输血，实时 PCR 可同时检测 HAV 和细小病毒 B19
戊型肝炎病毒（HEV）	Altona Diagnostics	Real Star HEV RT-PCR	m2000rt（Abbott Diagnostics） Mx3005P QPCR System（Stratagene） Versant kPCR Molecular System AD（西门子） ABI Prism 7500 SDS（Applied Biosystems） Rotor-Gene 6000（Corbett Research） Rotor-Gene Q5/6 plex Platform（QIAGEN） CFX96 Real-Time PCR Detection System（Bio-Rad） LightCycler 480 Instrument Ⅱ（罗氏）	20 U/ml	体外诊断 CE 标志 定量试验 实时 PCR
	Fast-Track Diagnostics	FTD Hepatitis ERNA	ABI 7500 ABI 7500 Fast Bio-Rad CFX96 LightCycler 480 Rotor-Gene 3000/6000/Q SmartCycler	188 U/ml	体外诊断 定量试验 实时 PCR CE 标志
	Hologic/Grifols	Procleix HEV	Panther	7 U/ml	输血 TMA 定性试验
	罗氏	COBAS HEV	COBAS6800	7 U/ml	输血 实时 PCR 定性试验

注：[a] 转录介导扩增实验（transcription-mediated amplification assay，TMA）

2. 戊型肝炎病毒　利用核酸扩增试验定量检测血液、粪便和其他机体组成中的 HEV RNA，引物定位于 HEV 基因保守区域，该法是诊断急性 HEV 感染的“金标准”。目前已商品化的检测方法见表 93-1。大多数实时 PCR 检测包括商品化检测，靶序列均为 ORF3[144-145]。在全自动平台上进行的转录介导扩增试验非常适合高通量检测[146]（表 93-1）。逆转录液滴数字 PCR 不需要标准曲线，并给出了 HEV RNA 的绝对数量[147]。最后，环介导恒温扩增（loop-mediated isothermal amplification，LMAP）技术使 HEV RNA 的检测无须特殊设备且为一步、单管扩增[148]。目前的检测限为 7～188 U/ml。定量分子检测也被用于评估抗病毒治疗的病毒学应答[131]。

八、分离程序

诸多原代甲型肝炎病毒分离株适合细胞培养。内部核糖体进入位点（IRSE）的突变增强了特殊细胞系中与帽无关的病毒翻译，而蛋白质 2B 和 2C 的突变促进了所有培养细胞中病毒的复制[149-151]。现已建立基于细胞系的标准空斑试验来测定感染病毒滴度。这些方法提供了关于食品和环境中甲型肝炎病毒存活率的数据，也可用于

风险建模和风险评估研究[152]。

有效的戊型肝炎病毒细胞培养株非常少见，且仅限于HEV基因3型和4型[153-154]。ORF1多肺氨酸区域的人类基因插入片段似乎在病毒的适应中起着重要的作用[22,27,155]。HEV培养所用的细胞株主要为HepG2/C3A、A549/D3和PLC/PRF/5细胞系[18,155-157]。有学者还研发了戊型肝炎病毒的三维立体细胞培养[158]。由于没有明显的细胞病变效应，因此，应用荧光染色标记的多克隆或单克隆特异性抗体检测感染HEV的细胞或用通过检测细胞培养上清液中的HEV RNA来检测病毒生长。相对甲型肝炎病毒，使用感染终点法来评估食品或环境中戊肝病毒的稳定性和通过特定病毒传播途径的感染风险。这些方法也用于血浆衍生药物产品的不同制造步骤的灭活或清除研究。尽管细胞培养系统对科学研究非常有用，但对HAV和HEV没有诊断价值。

九、鉴定和分型系统

HAV基因分型最初是通过对VP1-2A交接区168个核苷酸片段进行测序分析确定[159-160]。但是，目前将HAV分为6种基因型是基于来自完整VP1区域的序列[161]。因此，VP1是甲型肝炎分子流行病学研究和疫情调查的首选区域。

HEV基因型和亚基因型可以通过测序HEV基因组的不同区域来确定，如ORF2或ORF1聚合酶区域。这对于确定传染源和确定利巴韦林(ribavirin)治疗失败的病毒感染患者其聚合酶是否突变具有重要意义[134-135]。

得益于新一代测序技术，HAV和HEV的全基因组序列及变异体的宿主内谱提供了病毒株的详细特征。

十、血清学试验

(一)甲型肝炎病毒

采用酶或化学发光免疫法，在微板和多参数自动化模式下检测样本中抗HAV IgM和IgG，该法已有商品化试剂(表93-2)。目前，市面上还没有商品化的胶体金免疫层析快速检测试纸条。HAV免疫测定法在敏感性和特异性方面的诊断性能已得到很好的验证(>95%)。

表93-2 商品化抗HAV抗体和抗HEV抗体免疫法检测

病毒	标志物	制造商	产品名称	检测类型
甲型肝炎病毒(HAV)	抗HAV IgM	雅培	Architect HAVAb-IgM	自动化
		罗氏	Cobas抗HAV IgM	自动化
		生物梅里埃	Vidas HAV IgM	自动化
		西门子	AdviaCentaur抗HAV IgM	自动化
		贝克曼-库尔特	Access HAV IgM	自动化
		索林	Liaison HAV IgM	自动化
		Ortho	Vitros抗HAV IgM	自动化
	抗HAV IgG	雅培	Architect HAVAb-IgG	自动化
	抗-HAV所有抗体	罗氏	Cobas抗HAV	自动化
		生物梅里埃	Vidas抗HAV Total	自动化
		西门子	Advia Centaur抗HAV Total	自动化
		贝克曼-库尔特	Access HAV Ab	自动化
		Diasorin	Liaison Anti-HAV	自动化
		Ortho	Vitros Anti-HAV Total	自动化
戊型肝炎病毒(HEV)	抗HEV IgM	万泰	HEV IgM快速检测	快速检测
		MP Diagnostics	Assure HEV IgM快速检测	快速检测
		万泰	HEV ELISA IgM	微孔板
		MP Diagnostics	HEV IgM ELISA	微孔板

（续　表）

病毒	标志物	制造商	产品名称	检测类型
		Adaltis	EIAgen HEV M	微孔板
		Mikrogen	recomWELL HEV IgM	微孔板
		Euroimmun	ELISA 抗病毒 HEV IgM	微孔板
		生物梅里埃	Vidas Anti-HEV IgM	自动化
	Anti-HEV IgG	万泰	HEV ELISA IgG	微孔板
		MP Diagnostics	HEV IgG ELISA	微孔板
		Adaltis	EIAgen HEV G	微孔板
		Mikrogen	recomWELL HEV IgG	微孔板
		Euroimmun	ELISA 抗病毒 HEV IgG	微孔板
		生物梅里埃	Vidas 抗 HEV IgG	自动化

血清中是否存在抗 HAV IgM 是急性感染的一个关键标志（图 93-3）。抗 HAV IgM 可在丙氨酸氨基转移酶水平升高时检测到，并可持续 3～6 个月。出现假阳性的结果也是可能的，尤其是当临床表现不能反映 HAV 感染并缺乏抗 HAV IgG。免疫系统的非特异性多克隆激活也可检测到 IgM[162]。在这种情况下，可以检测到抗 HAV IgG，并且对 HAV IgG 的亲和度很高[162]。因此，血清学试验应仅限于符合肝炎临床症状的患者，特别是在地方性流行较低的地区。

抗 HAV IgG 单独存在是既往感染或接种过疫苗的一个标志（图 93-3）。在未接种疫苗的个体中，抗 HAV IgG 检测可用于确定需要接种疫苗的人，但筛查的有效性取决于年龄和流行病学参数。由于甲型肝炎疫苗的高效性，因此，不需要在接种后进行检测。

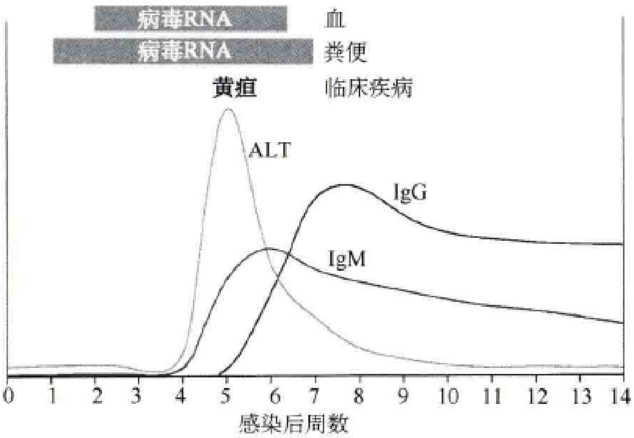


图 93-3　不同时间点的病毒检测（HAV RNA 或 HEV RNA）和血清学反应（IgM 和 IgG 抗体）。ALT. 丙氨酸氨基转移酶

（二）戊型肝炎病毒

大多数抗 HEV IgM 和 IgG 的检测采用酶免疫测定法，在欧洲和亚洲以微孔板形式出售[163]（表 93-2）。多参数自动化仪器正在研发中[164]。不同国家也有几种免疫层析分析方法可用于快速诊断[165-166]。这些床旁检测方便并在数分钟内得出结果，这对于资源有限的国家非常方便。所使用的抗原通常是来自 HEV-1 株的重组蛋白 ORF2 和（或）ORF3。这些免疫测定方法的诊断性能差异很大，必须仔细评估[163,167]。

血清中是否存在抗 HEV IgM 是急性感染的重要标志（图 93-3）。以验证过的 PCR 试验为参照，经研究显示 IgM 免疫测定法（包括快速检测），对于免疫功能强的患者其敏感性＞97%，对于免疫抑制患者敏感性为 80%～85%，特异性＞99.5%[165-166,168]。值得注意的是，对核酸检测阳性的急性戊型肝炎患者进行纵向随访，观察显示患者体内抗 HEV IgM 可持续 6～12 个月[91]。有学者研究使用不同血清板比较 IgM 测定的性能[163,167,169-170]。在一项研究中，使用来自免疫功能正常和免疫功能低下且已证实戊肝病毒感染（HEV RNA 阳性）的个体的血清，对 5 种 IgM 检测试验进行了比较[167]。所有检测结果只有 71%的一致性。在另一项研究中，对 10 个血清转换板的单个样本进行检测时也存在差异[163]。然而，很难比较不同研究的结果，因为测定性能的差异可能与所采用的试剂的不同版本有关[169]。

抗 HEV IgG 单独存在是既往感染的一个标志

(图 93-3)。由于 IgG 免疫测定法在分析敏感性上存在较大差异,因此很难比较不同实验室方法获得的不同人群的血清效价。使用国际标准(世界卫生组织于 2002 年建立的标准试剂;国家生物标准与控制规范 95/584),商品化抗 HEV IgG 检测限从 0.25~2.50 WHO U/ml。欧洲一项关于 HEV 血清阳性率的 meta 分析强调[171],最敏感的免疫分析法(万泰检测)产生的抗 HEV IgG 血清阳性率最高。许多研究表明,在最初用不敏感的"第一代"IgG 测定法筛选的再检测人群中,当使用更敏感的已验证测定法时,血清阳性率升高了 2~4 倍[86,172-175]。抗 HEV IgG 浓度的测定可能有助于评估自然感染或接种疫苗后再次感染的风险[176-178]。

十一、结果的评价、解释和报告

关于甲型肝炎病毒感染,抗 HAV IgM 的血清学试验对确定新发病例和暴发流行至关重要。分子鉴定技术的日益普及使人们有可能将看起来零星的病例与缓慢进展的跨国疫情联系起来[51,179]。在欧洲、澳洲地区,以及美国和其他许多国家,甲型肝炎属于应上报的疾病,患者暴露后可通过卫生措施和主动或被动免疫预防加以管理。在全球范围内,最佳的疫苗接种政策和补救措施是建立在抗 HAV IgG 阳性率的基础上。

关于 HEV 感染,最近获得的高性能血清学和分子设备使人们对全球流行病学(许多工业化国家由于人畜共患病传播而具有地方性)和病理学(慢性戊型肝炎,神经学表现)的认识发生了重大变化。目前,最新的抗 HEV IgM 检测具有良好的性能,适用于常规诊断。同样,HEV RNA 检测在免疫缺陷患者中是也必要的,因为该部分人群的体液免疫应答经常受损。当 HEV RNA 持续存在 3~6 个月时,检测 HEV RNA 对于识别慢性感染和监测基于减少免疫抑制或抗病毒治疗的干预措施也是必要的。大多数欧洲国家都建立了监测系统,这些国家的感染主要由 HEV 基因 3 型引起,这是动物宿主中最常见的病毒基因型[180]。然而,监控的策略和算法非常不同。法国、德国、荷兰、丹麦和西班牙通过参考实验室进行监测。戊型肝炎在部分国家是一种应该上报的疾病。最后,对输血传播 HEV 的认识影响了受血者风险的评估,并在多个发达国家定义了改善血液安全的最佳策略[76]。

参考文献请扫二维码查阅

第94章　丙型肝炎病毒

MICHAEL S. FORMAN，BRYAN R. COBB，ALEXANDRA VALSAMAKIS

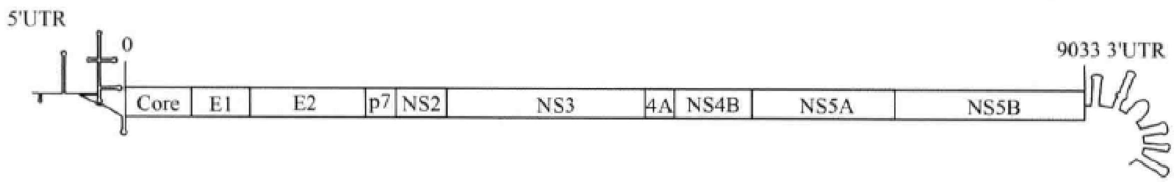
（杨晓莉　译；王大燕、汤一苇　审校）

一、分类

丙型肝炎病毒（hepatitis C virus，HCV）属于黄病毒科（Flaviviridae），丙型肝炎病毒属（*Hepacivirus*）。解旋酶（helicase）序列的进化分析用于研究 HCV 与该科其他病毒的亲缘性[1]。数据表明 HCV 与非致病性人类病毒 GBV-C 亲缘关系最近，其次是可感染非人类宿主的瘟病毒属牛病毒性腹泻病毒（bovine viral diarrhea virus）和猪瘟病毒（hog cholera virus）。HCV 与黄病毒属（Flavivirus genus）中可感染人类的虫媒传播病毒如黄热病毒（yellow fever virus）、登革热病毒（dengue virus）及西尼罗河病毒（West Nile virus）关系较远。

二、病毒描述

HCV 基因组为单正链 RNA，全长约 9.6 kb。仅含有一个长的可读框（ORF），在 ORF 两端为 5′末端和 3′末端非编码区（untranslated region，UTR）（图 94-1）。5′末端 UTR 高度保守而 3′末端 UTR 包含有一个短的可变序列、多聚 U 区（poly U）和一个高度保守区。结构蛋白基因包括核心蛋白（core）、跨膜蛋白（p7）及 2 种包膜蛋白（E1 和 E2）。HCV 病毒颗粒以脂病毒颗粒的形式存在，是由血清脂蛋白（胆固醇、甘油三酯、载脂蛋白和磷蛋白）与病毒糖蛋白结合而形成[2]。



蛋白质名称	作用	核苷酸位置	氨基酸位置	氨基酸长度	大小
Core	核衣壳蛋白	342	1	191	p21
E1	受体结合，病毒侵入？	915	192	192	gp31
E2	受体结合，病毒侵入？	1491	384	363	gp70
p7	病毒离子孔道蛋白	2580	747	63	p7
NS2	NS2/3 Zn- 依赖蛋白酶	2769	810	217	p21
NS3	NS2/3 Zn- 依赖蛋白酶	3420	1027	631	p70
	NS3/4A Zn 蛋白酶，解螺旋 -NTP 酶				
NS4A	NS3/4A Zn 蛋白酶辅因子	5313	1658	54	p8
NS4B	膜网形成	5475	1712	261	p27
NS5A	磷蛋白质	6258	1973	448	p58
NS5B	RNA 依赖的 RNA 聚合酶	7602	2421	591	p68
F1 HCA					

图 94-1　HCV 基因组和蛋白编码方案。UTR. 非编码区；E. 包膜；NS. 非结构基因；nuc. 核苷酸；编码参考文献[92]和[93]

HCV在肝细胞的复制是由一个多步骤的进入过程启动的[3]。病毒结合脂蛋白与脂蛋白的细胞受体——清道夫受体B类1型(scavenger receptor class B type 1,SR-B1)结合,暴露E2,然后结合细胞的跨膜蛋白CD81,触发紧密连接蛋白的结合和网格蛋白介导的内吞作用。在核内体中,E1和E2介导病毒体包膜与核内体膜的pH依赖融合。在细胞质中,HCV基因组ORF被翻译成一个单一的多聚蛋白(大约3000个氨基酸),随后被宿主蛋白酶及*NS2*、*NS3*和*NS4A*基因编码的病毒蛋白酶分解。*NS3*基因也编码解旋酶。p7区编码传染性病毒复制所必需的蛋白[4],但其确切功能尚不清楚。由于依赖RNA的RNA聚合酶NS5B(图94-1)缺乏有效的校正活性,导致在复制过程中大量的基因突变及感染者体内准病毒株(quasispecies)的产生。NS5A是一个多功能的非结构性磷酸化蛋白[5],是HCV复制复合体的关键成分并与复合体的其他组分结合,包括依赖RNA的RNA聚合酶、RNA和亲环素A(为HCV RNA复制所需的宿主蛋白)。NS5A在病毒颗粒的组装中也发挥作用。目前,直接作用抗病毒(direct-acting antiviral,DAA)药物的主要作用靶位是NS3/4蛋白酶、NS5A和NS5B聚合酶(表94-1)。

表94-1 HCV DAA类和目前推荐的药物

NS3/4 蛋白酶抑制剂	NS5A 抑制剂	NS5B 聚合酶抑制剂
格拉瑞韦	达拉他韦	达塞布韦
glecaprevir	艾尔巴韦	索非布韦
paritaprevir(与利托那韦配伍)	雷迪帕韦 奥比帕利	
西咪匹韦	Pibrentasvir	
voxilaprevir	Velpatasvir	

目前,根据基因组序列的异质性,将HCV分为7种主要的基因型(Gts)和50多个已知的亚型[6]。基因型和亚型的核苷酸差异分别为30%～35%和20%～25%。Gt1～Gt3呈世界性分布,感染主要分布在欧洲和北美。在美国,各年龄组人群感染的HCV主要是Gt1(占75%),其次为Gt2(占13.5%)和Gt3(占5.5%)。Gt1亚型(1a和1b)对当前直接作用抗病毒药物治疗方案的选择很重要(见"临床意义")。在美国和亚洲地区,Gt1a比Gt1b更普遍。在美国,感染Gt1的患者中,亚型1a和1b分别占75%和25%。在亚洲地区,95%为1a,5%为1b[7]。在欧洲地区,Gt1a和1b的患病率相当(各占50%)[7]。Gt5主要在南非发现,Gt6遍布亚洲,Gt7曾在刚果移民者体内检测到,其流行区域尚不清楚[8-9]。

基因重组是HCV遗传异质性的另一个来源,最初认为这种异质性比较罕见,但现在越来越被认识。它可能发生在机体同时感染不同的丙肝病毒株期间。经测序显示,重组断点最常出现在NS2～NS3区[10-11]。大多数流行的突变体有5个来自Gt2的序列,3个来自其他基因型(Gt2/Gt1、Gt2/Gt5和Gt2/Gt6)[11]。重组Gt2的优势可能具有一定的生物学基础(如适应性增加)。另外,这些变异可能在全球水平上被研究,而其他变异可能被识别为治疗和相关基因型检测在全球范围内扩展。Gt2/Gt1变异株最为普遍,其中2k/1b病毒株最为常见[12]。该病毒首先是在圣彼得堡(St. Petersburg)被发现,1923－1956年在苏联出现[11,13]。它在苏维埃共和国如格鲁吉亚高度流行,在所有慢性HCV感染患者中的患病率约为20%[14]。该病毒也存在于法国、德国和以色列等人口从苏联移民的国家。在这些国家中,2k/1b已在移民前可能感染的个人和有静脉吸毒等高危行为的非移民者中被确认,这表明该变体现在与其他地方性毒株一起更广泛地传播[11-12,15-16]。

携带Gt2/1变异的慢性HCV感染在临床上很重要,因为它们不能被常规鉴定,也无法通过适当的DAA方案进行治疗。HCV基因分型分析查询重组断点(5′UTR、core、E1)上游序列时,常将这些变异识别为Gt2感染,DAA靶基因(NS3/4、NS5A、NS5B)下游则为Gt1序列。这些基因型不准确的患者在接受Gt2特异性治疗时,病毒学复发率很高,但使用Gt1特异性或泛基因型治疗可以有效治愈[12,17]。

三、流行病学和传播

HCV是一个全球关注的病原体,感染人群已超过1.5亿。在美国,HCV主要经血液传播,已有约300万的慢性感染者[18]。美国急性丙型肝炎的发病率为0.3/100 000,不包括漏报和无症状感染,每年估计有19 000例新感染者[19]。在血液筛

查年代，大多数的传播发生在通过各种途径暴露于低病毒感染物后，如静脉注射毒品、性传播和职业暴露如针刺伤等[20]。性接触曾经认为是不常见的传播方式，但现在这一点被越来越多的学者所重视，尤其是在感染 HIV 和未感染 HIV 的男性同性恋（men who have sex with men，MSM）中。在感染 HIV 的 MSM 中，1984－2012 年的一项 meta 研究分析表明，未注射毒品的人的发病率增加，血清阳性率与创伤性行为相关[21]。在未感染 HIV 的 MSM 中，在开始对艾滋病病毒进行接触前预防的队列中观察到的患病率高于预期；HCV 测序显示，在该地区感染 HIV 和未感染 HIV 的个体中存在相似的毒株，这表明共享的性网络在 HCV 传播中起着关键作用[22]。在阿片类药物流行之后，注射药物的使用在美国引发了丙肝病毒感染的激增。丙肝发病率从 2006－2012 年逐年攀升，增长最快的是小于 30 岁年轻的非城市白人[23]。

四、临床意义

急性感染的临床特征如图 94-2 所示。大多数患者无症状。急性感染者约有 25%可自发清除病毒，其他发展为慢性感染。在急性感染期的肝炎表现实际上就是正向的指征，因为表现出感染早期的、显著的与自发性病毒清除相关的抗病毒 T 细胞应答。这些应答在发展为慢性期的患者中很低或是不存在[24]。

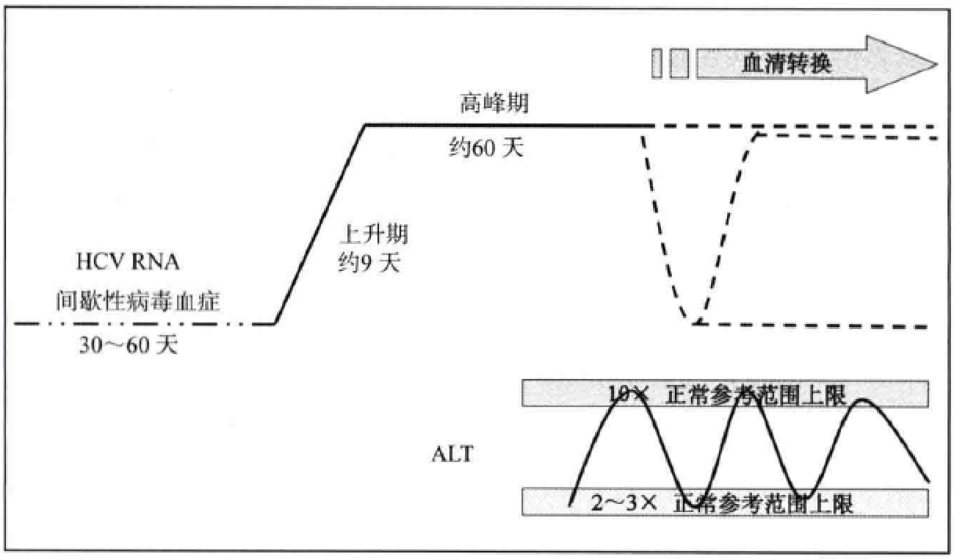


图 94-2 低病毒量接触，例如，偶然职业针刺伤暴露或生活接触暴露后急性期丙型肝炎的临床特征[58,77,94]。较高剂量暴露（受污染的血液制品输血）的特征可能不同，根据针刺伤暴露后评估间歇性的病毒血症的分期[77]。来自于血清学转换模式的其他动力学特征[58]。ALT. 丙氨酸氨基转移酶。虚线表示由外周血中 HCV RNA 水平来定义的潜在病毒血症模式。引自参考文献[58]

为什么某些患者能清除感染而另一些患者却发展为慢性丙型肝炎病毒感染的原因尚不清楚。为了探讨调节清除的机制，全基因组相关性分析已用来确定那些主导自发性清除与进展为慢性期感染的遗传决定因素。该方法已发现在 DQA1-DQB2 HLA Ⅱ区域[25] rs4273729 存在单核苷酸多态性（single nucleotide polymorphism，SNP），并且 *IL28B* 基因的上游有多个 SNPs[26-28]，其中 rs12979860[25] 变异与清除和重叠效应独立相关性最强。在 HLA Ⅱ rs4273729 的 G 纯合子等位基因和在 IL28B rs12979860 的 C 纯合子等位基因与清除相关。HLA Ⅱ rs4273729 的 C 纯合子等位基因和 rs12979860 的 T 纯合子等位基因与慢性感染相关。杂合子更倾向于慢性感染而不是清除。*IL28B* 基因编码干扰素 γ3，这是一种与干扰素 α 和 β 类似的刺激信号关联反应的干扰素，但需通过不同的受体。*IL28B* 基因型的全球地理分布可部分解释在急性感染中显现的种族差异[27,29]。与清除相关的单倍型在东亚的人口中较为普遍，其自发清除率很高。与进展为慢性感染相关的单倍型更高发生于非洲种族人群中，他们的慢性感染率高。HLA Ⅱ类和 IL28B 如何调节免疫反应来

介导 HCV 清除的遗传决定因素尚不清楚。

出现病情进展的慢性丙型肝炎病毒感染患者的比例相对较小。几十年来，进行性肝损害发展为肝硬化的比例占慢性 HCV 感染者的 10%～20%，而慢性 HCV 感染者出现肝衰竭或肝细胞癌的比例为 5%[30]，然而由于感染者的数量大，总的疾病负担值得关注。事实上，在美国慢性期丙型肝炎病毒感染引起的肝衰竭是肝移植的首要原因[31]。疾病进展的风险因素包括引起其他肝损伤的疾病、行为（如合并乙肝病毒感染和饮酒）或抗病毒免疫受损（如人免疫缺陷病毒感染）。流行病学研究显示，男性和高龄感染也是高危和疾病快速进展的相关因素。

HCV 与其他慢性病毒感染如 HIV 和乙型肝炎病毒（hepatitis B virus，HBV）不同，包括病毒载量和基因型在内的病毒学指标都不能预测疾病进展或反映慢性丙型肝炎的疾病严重程度[32-33]。一旦发生慢性丙型肝炎感染，病毒载量相当稳定[33]，与以病毒血症为代表的丙型肝炎病毒的复制水平相比[34]，人们发现疾病进展速度更与肝病的严重程度相关，肝病的严重程度可以由早期肝活检中的肝纤维化程度来代表[35]。

随着 DAA 方案的批准，慢性丙型肝炎的治疗发生了革命性的变化。这些药物在临床试验和日常使用中已被证实是高度有效的。Gt1、Gt2 和 Gt3 的治愈率约为 90% 或更高[36-39]。即使在 HCV/HIV 混合感染的患者中，也显示出了较高的治疗效果。由于干扰素 α 联合利巴韦林的反应率较低，这类患者被认为很难治疗。HIV/HCV 混合感染患者对一线方案的应答率与 HCV 单感染者相当；不良反应是可以控制的，如果使用兼容的 DAAs，接受抗逆转录病毒治疗的患者可以得到安全的治疗，极大地简化了混合感染者的 HCV 治疗[40]。因此，指南现在推荐 DAA 治疗所有合并感染 HIV/HCV 的患者预防重大疾病的发生和发展，这些并发症在混合感染患者中比在 HCV 单感染患者中更常见、更迅速[41-43]。

表 94-1 列出了当前推荐的 DAAs 及其靶点。药物在本书第 113 章有更详细的描述。DAA 方案（首选和备选方案）见表 94-2。有关丙肝治疗所有方面的建议不断更新，可在网站获得（http://www.hcvguidelines.org 和 http://www.easl.eu/_clinical-practice-guideline）。目前用于诊断和治疗慢性丙型肝炎的试验见表 94-3。

表 94-2 目前 DAA 治疗慢性丙型肝炎的方案

给药方案	基因型	药物组合	治疗时间	备注
一线治疗方案	1a，1b	雷迪帕韦/索非布韦	8 周	基线 HCVRNA<6×10^6 U/ml
	1a，1b，4，5，6	雷迪帕韦/索非布韦	12 周	Gt1a 和 Gt1b：基线 HCV RNA≥6×10^6 U/ml
	1a，1b，4	艾尔巴韦/格拉瑞韦	12 周	Gt1a：如果基线 RAS 出现，加利巴韦林，延长治疗至 16 周
	1a，1b，2，3，4，5，6	glecaprevir/pibrentasvir	8 周	全基因治疗方案 Gt5 and Gt6：肝硬化延长治疗至 12 周
	1a，1b，2，3，4，5，6	索非布韦/velpatasvir	12 周	全基因治疗方案
替代方案	1a，1b，4	利托那韦-boosted paritaprevir/ombitasvir/达塞布韦	12 周	Gt1a 和 Gt4：加利巴韦林
	1a，1b	西咪匹韦/索非布韦	12 周	
	1a，1b，2，3	达拉他韦/索非布韦	12 周	

表 94-3 HCV 感染的诊断和管理应用

试验用途	试验类型（合格样本）	使用适应证
急性丙型肝炎的诊断	HVC RNA 定量或定性检测	暴露后，直接检测丙型肝炎病毒
	NAAT（血清或血浆）	感染后（可能是散发的，需要连续监测）
	抗HCV 免疫分析法检测抗 HCV IgM 和 IgG（血清或指血全血）	暴露后，记录血清转化

（续 表）

试验用途	试验类型（合格样本）	使用适应证
慢性丙型肝炎的诊断	抗HCV免疫分析法检测抗 HCV IgM 和 IgG（血清或指血全血）	感染筛查
	HVC RNA 定量或定性检测 NAAT（血清或血浆）	确认感染和区别急性感染和慢性感染
慢性丙型肝炎的治疗管理	HCV 基因型测定（血清或血浆）/Gt1 亚型测定	选择合适的治疗方案
	NAAT 定量测定 HCV RNA（血清或血浆）	确定某些疗法的治疗时间（治疗方案见表 94-2）；疗效监测
	抗病毒抗性相关替代检测（血浆）	选择合适的治疗方案治疗特定的 HCV 基因型

五、标本的采集、运输和储存

HCV 核酸体外扩增试验（nucleic acid amplification tests，NAATs）和血清学试验可用血清或血浆。抗凝剂肝素可抑制 Taq 聚合酶（Taq polymerase）活性，PCR 检测应避免使用肝素抗凝的血浆。应按第 81 章中描述的标准技术规范从全血中分离血清和血浆。标本处理和储存的要求根据不同检测而定，例如，推荐的收集和处理间隔时间、储存条件和冻融次数，说明书上应给出对应的信息。全血标本处理前一般可在 25℃条件下进行运输。干血斑（dried blood spots，DBSs）已被用于 HCV 血清学和核酸体外扩增检测，目的是将慢性丙型肝炎的诊断和治疗推广到资源有限的环境中。用干血纸片法检测 HCV 抗体和定性 HCV RNA，已取得准确结果，但不是 HCV RNA 定量检测[44-46]，这表明干血纸片法可鉴别慢性丙型肝炎患者，但不适宜用于目前推荐的治疗监测。在 HCV 核心蛋白抗原检测试验中，干血纸片法敏感性低于血清[47]。DBSs 在鉴别慢性感染的 HCV 血清学阳性个体方面的应用可能有限。目前，干血纸片法的用于 HCV 诊断检测尚未取得使用监管批准。肝组织基本不用于检测，只用于 Gt1 感染患者肝纤维化的病理学评估。

六、直接检查

（一）显微镜检查

通过电子显微镜观察，丙型肝炎病毒呈球形，直径为 55～65 nm，表面有 6 nm 的突起。用免疫组化（immunohistochemistry）和原位杂交技术（in situ hybridization）分别检测肝组织中的丙型肝炎病毒抗原和核酸。由于这些方法敏感性和特异性不高，因此通过显微镜检测丙型肝炎病毒的临床实用性很低。

在 DAA 治疗时期，确定肝病状态的组织学评估主要用于确保对桥纤维化/肝硬化患者的适当治疗。与没有肝硬化的患者相比，这些患者的慢性丙肝病毒感染更难治疗，需要更严格的治疗方案（http://www.hcvguidelines.org；http://www.easl.eu/_clin-practice-guide）。组织学评估的其他用途包括筛查丙肝和治疗肝硬化并发症等。

鉴于肝活检存在的诸多缺点（本身的有创性、潜在的并发症和取样误差），现已研发出多种无创试验，包括通过超声评估肝硬度（瞬时弹性成像）和通过外周血作为替代标志物评估肝纤维化。无创试验可用于诊断晚期纤维化，但很难区分中期纤维化的不同阶段。因此，如果需要对中期准确分级，仍然首选组织活检。最新的治疗指南中已建议晚期肝纤维化/肝硬化用无创检测方法（http://www.hcvguidelines.org；http://www.easl.eu/_clinicalpractice-guideline）。

（二）抗原检测

HCV 核心抗原检测/定量试验已发展成为 HCV RNA 检测的替代方法。文献中最广泛使用和报道的分析方法是 ARCHITECTHCVAg（Abbott Diagnostics，Chicago，IL），这是一种化学发光微粒子免疫分析方法，在欧洲使用（Conformité Européene），但尚未在美国获得监管批准。在资源有限的情况下，该试验还是很有用的，因为其检测对象稳定（样品无须超低温度保存）、仪器简单和操作程序相当简化从

而大大减少了操作或培训的负担。根据不同基因型，该分析的敏感性是 3～13 fmol/L(相当于通过核酸扩增检测约 1000 U/ml HCV RNA)。ARCHITECTHCVAg 检测方法的线性范围在 3～10 000 fmol/L，检测结果与 HCV RNA 定量值有很好的相关性[48-50]。

这些测试在诊断 HCV 感染和 DAA 治疗期间的治疗监测中的效用已经被研究。对已知慢性 HCV 患者的核心抗原检测结果的 meta 分析显示，与 NAAT 相比，对诊断慢性 HCV 的敏感性为 92%～97%，特异性为 99%[51-52]。这些数据表明，核心抗原检测可替代 NAAT 用于诊断 HCV 血清阳性的慢性 HCV 感染，特别是在资源有限的环境中，HCV 筛查目前是受限制的。在资源不受限制的国家，重点放在所有慢性感染患者的鉴别和治疗上，这些检测益处有限，由于其假阴性率较低，因此与 NAAT 相比意义重大。此外，在血清转换窗口期[52-53]和 DAA 治疗后的治疗结束反应记录[54]中，对于用核心抗原检测诊断急性 HCV 的研究显示，与 NAAT 相比表现较差，表明它们在这些情况下并非最优。

临床指南对核心抗原检测采取了不同的方法。欧洲 HCV 指南推荐在诊断和治疗监测过程中，如果没有 NAAT 时，使用这些测试作为替代检测方法，从而平衡实际的考虑和对与 NAAT 相比的次优性能的关注。相比之下，美国的 HCV 管理指南只推荐在所有临床应用中检测限为 25 U/ml 的 HCV NAAT。

(三)核酸检测/定量试验

1. 临床应用

(1)核酸扩增试验在急性丙型肝炎诊断中的应用：在许多传播案例中，针刺或输血暴露后最早 1 周内即可检测到 HCV RNA[55-57]，而发生血清学转化最少需要 4～6 周[58]。HCV 核酸检测可用于诊断血清学阴性的急性 HCV 感染者，由于病毒载量低，并且知道暴露后外周血中 HCV RNA 的早期检测是间断进行的[58]，所以建议采用灵敏的定性或定量核酸检测，见表 94-4[欧洲指南<15 U/ml(http://www.easl.eu/_clinical-practice-guideline)；美国指南≤25 U/ml，建议每 4～6 周检测(http://www.hcvguidelines.org)]。其他原因导致肝功能障碍的患者可考虑用急性感染的治疗方法，这类患者的病情可能因急性丙型肝炎而加重。急性感染采用“等、看”的方法处理，其基本原理是有约 25%的患者会自行清除感染。DAA 治疗通常用于进展为慢性感染的患者(HCV RNA 检测 2 次，至少间隔 12 周)，因为他们可以通过短期治疗而治愈(http://www.hcvguidelines.org)。

表 94-4 商品化 HCV NATT

方法(制造商)[a,b]	化学提取	扩增方法	监测范围 (log_{10} U/ml)[c]	检测限 (log_{10} U/ml)	参考文献
Aptima HCV RNA 定性检测 (Hologic)[a]	磁微粒/目标捕获	TMA	不适用	1.0	
Aptima HCV Quant Dx Assay(Hologic)[a,d]	磁微粒/目标捕获	TMA	1.0～8.0	血浆 0.6 血清 0.5	95
artus HCV RT-PCR QS-RGQ (Qiagen)[b]	磁微粒/总核酸	实时 PCR	1.5～7.4	1.3	96
COBAS AmpliPrep/ COBASTaqMan v2.0 (罗氏)[a,d]	硅基(总核酸)	实时 PCR	1.2～8.0	1.2	97
cobas 6800/8800 (罗氏)[a,d]	磁微粒/总核酸	实时 PCR	1.2～8.0	1.1	98
实时 HCV (雅培)[a,e]	磁微粒/总核酸	实时 PCR	1.1～8.0	1.1	99-101
Versant HCV RNA 1.0 (kPCR)(西门子全球医疗)[b]	硅基(总核酸)	实时 PCR	1.2～8.0	1.2	102
Xpert HCV Viral Load Test(Cepheid)[b]	未报道	实时 PCR	1.0～8.0	血浆 0.6 血清 0.8	103

注：[a] 所有试剂参照按欧洲体外诊断指南 98/79/EC 并经 FDA 批准和 CE 标志；[b] CE 标志参照按欧洲体外诊断指南 98/79/EC；[c] 定量下限到定量上限为未稀释的原始标本；[d] 美国 FDA 批准用于慢性丙型肝炎诊断和治疗监测；[e] 美国 FDA 批准用于治疗监测

(2)核酸扩增试验在慢性丙型肝炎诊断中的应用:大多数急性 HCV 感染为无症状性,大多数患者发展为慢性期才被确诊。慢性感染患者一种是无症状感染,通过 HCV 筛查或与护理的关注而发现,另一种是由于疾病进展出现临床症状。慢性丙型肝炎的诊断是采用抗体筛查试验证明感染,HCV RNA 核酸检测试验反映病毒复制(表 94-3)。在免疫功能不全的个体中,由于抗体应答反应受损会导致血清学试验结果呈假阴性,用核酸扩增试验检测 HCV RNA 的存在是诊断慢性 HCV 感染的主要方式。依靠核酸扩增试验作为 HCV 感染筛查的主要检测手段,在 HIV 人群中显得尤为重要。第二代和第三代血清学试验结果呈假阴性的 HIV-1 感染者约占 5%。已发现 CD4 细胞计数低(200 cells/μl)是一个风险因素[59-60]。因此无论血清学结果如何,对于体液免疫反应可能受到损害的 HIV/HCV 混合感染者,都应该进行核酸扩增试验以准确诊断 HCV 慢性感染。

(3)核酸扩增试验在慢性丙肝患者治疗管理中的应用:在 DAA 治疗时期,NAAT 应用仍然至关重要,与以干扰素 α 为主的治疗方案相比,NAAT 的使用已经大大简化。表 94-3 总结了它们在诊断和管理中的作用,进一步解释见图 94-3。在治疗开始前,应确定所有患者的 HCV 基因型和 RNA 病毒载量水平。基因型用于确定治疗方案和疗程(治疗方案和"基因分型"见表 94-2,下文将进一步介绍 NAAT)。在聚乙二醇化干扰素 α/利巴韦林时期,基因型在预测治疗反应方面也很有用;同时,不同基因型对 DAA 的反应率一般都很高。抗性相关替代物(resistance associated substitutions,RASs)在 DAA 启动之前应该检测,在考虑具体药物疗法治基因型的治疗方案(见表 94-9 的摘要和"抗病毒药物易感性"部分,下文将进一步介绍讨论 RAS 检测)。在治疗期间,建议在治疗第 4 周和停止治疗后 12 周复查 HCV RNA。在治疗结束和治疗终止 24 周后,可选择进行额外的 HCV RNA 评估。建议使用敏感的定量或定性 NAAT(表 94-4)进行检测[欧洲指南<15 U/ml(http://www.easl.eu/_clinpractice-guidelines);美国指南≤25 U/ml(http://www.hcvguidelines.org)]。HCV RNA 基线定量至关重要,因为它是治愈记录的起点。治疗前定量检测 HCV RNA 的时间限制在第 4 周;大多数患者此时没有可检测到的 HCV RNA。结束治疗试验是可选的,用于记录治疗效果。HCV 治愈为可检测到的 HCV RNA 的持续缺失或持续病毒学应答(sustained virologic response,SVR),在治疗结束后 12 周(SVR12)通过 HCV RNA 定量确定。在干扰素 α 为基础的治疗方案时期,SVR 通常在治疗结束 24 周后确定。DAA 的随访期缩短至 12 周,通过对大量临床试验数据的分析表明,随访 12 周和 24 周对 SVR 的预测性相同[61]。大多数达到 SVR12 的患者被认为已治愈。在治疗停止后 12 周内复发是罕见的,一项临床试验数据研究表明,0.2%的接受治疗的患者出现 SVR12 复发的情况[62]。SVR12 后的复发更常见的是有高危行为的个体再次感染,而不是真正的复发[63]。

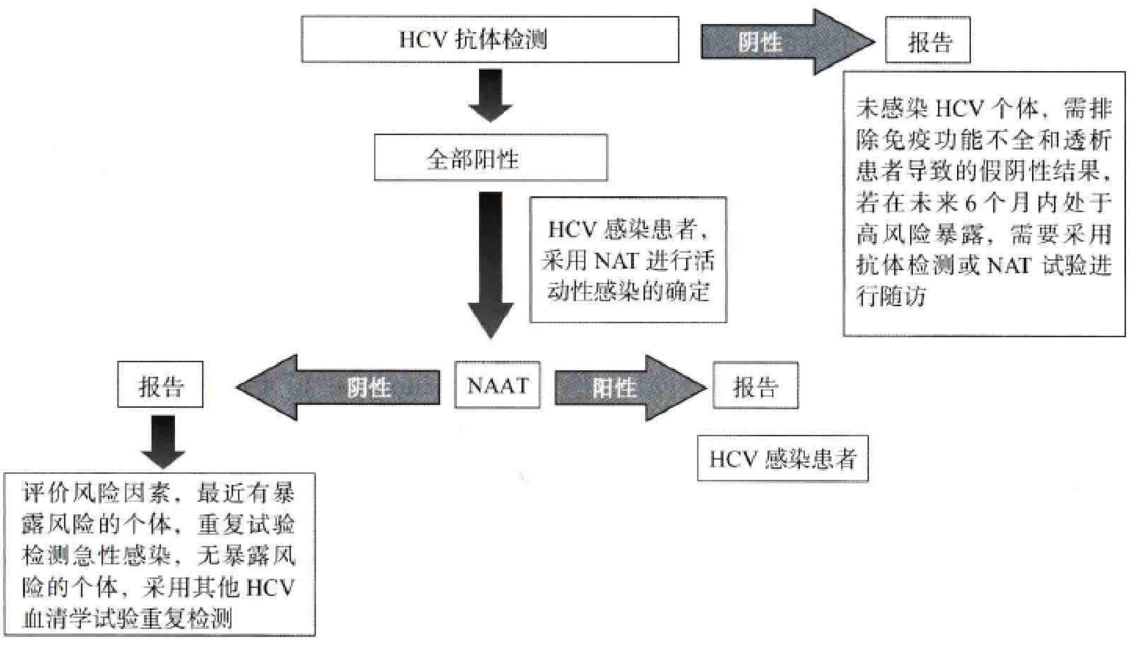


图 94-3 检测 HCV 感染的推荐检测程序。来自参考文献[85]

2. HCV 定性和定量核酸扩增试验 商品化 HCV NAAT 有定性和定量 2 种检测方式(表 94-4)。核酸扩增定性试验可用于诊断 HCV 血清学阳性患者的慢性丙型肝炎。目前已有一种测试(Aptima HCV RNA 定性分析)投入市场,采用转录介导扩增试验(表 94-4,详情请参阅第 7 章)。采用实时逆转录 RT-PCR 和转录介导的扩增试验(transcription-mediated amplification,TMA)方法来定量 NAAT 是可行的(表 94-4)。在美国,一些定量 NAAT 已经获得批准用于慢性 HCV 的诊断和治疗监测适应证;另外一些只允许用于治疗监测(表 94-4)。所有试验扩增和检测高度保守 5′UTR 序列。为了提高实验室工作效率,减少劳动需求,缩短实验时间,各种 HCV NAAT 定量检测平台最近被引入。例如,一些仪器(Panther, Aptima HCV Quant Dx 和 cobas 6800/8800, cobas HCV)提供随机访问测试和完全自动化等功能,直接从初始离心管进行测试。其他的在单独的卡盒中进行测试(GeneXpert,Xpert HCV 病毒载量),允许按需、随机测试。

自 1997 年起,已经获得了世界卫生组织国际校准用标准品,HCV RNA 量化为国际单位每毫升(U/ml)。目前正在使用的是第四代国际标准。它是由感染了 Gt1a 的患者血浆组成,在血清转化之前采集血液。该血浆在 HCV 血清学阴性/HCV RNA 阴性的血浆中进一步稀释混合。第五代国际标准是生物标准,其浓度是通过在多个地点(11 个国家的 17 个实验室,使用 5 种不同的商品化测试)进行检测得出的;它被赋值为 5.0 $\log_{10}$U/ml。为了实现定量的纵向一致性,本标准与第二代、第四代国际标准品进行了平行校准。尚无关于目前的国际标准是否对所有可用的 HCV RNA 定量检测和所有基因型的定量结果进行了协调的研究。

七、分离程序和鉴定

HCV 是一个苛养病毒,在临床病毒学常规或参考实验室无法从培养的哺乳动物细胞(原代或传代)中分离获得。在特殊实验室,通过 HCV 分子克隆转染宿主细胞后的感染病毒分离系统[64-66]或使用最新报道的肝癌细胞株[67],病毒可以繁殖。这些研究进展对发展 DAA 和疫苗来说是强大的工具,但它们尚未用于诊断。

八、基因分型

明确 HCV 基因分型和 Gt1 亚型(确定 Gt1a 和 Gt1b)仍然很重要。这些信息用于临床管理,以确定 DAA 治疗方案(表 94-2),并根据存在的基因型和正在考虑的治疗方案,指导 RAS 检测的需要(表 94-10)。今后关于使用全基因型治疗方案而非特异性基因型的建议将决定这些检测是否继续具有临床应用价值。

采用多种生化方法(优缺点总结见表 94-7)的商品化(表 94-5)和实验室自主研发(表 94-6)的 NATT 可以确定 HCV 基因型和亚型。大多数商品化的检测利用依赖于检测试剂特异性的依赖序列的化学方法来精确的确定 HCV 基因型和亚型,例如,实时 RT-PCR 利用引物/探针与靶 HCV RNA 结合的特异性来确定 HCV 的基因型和亚型,而反向杂交(reverse hybridization)是利用样本衍生的 HCV 扩增子序列与结合在尼龙膜上的互补序列杂交来确定 HCV 的基因型和亚型。在序列相关检测中,基于 5′UTR 序列的检测方法通常可用于基因型的测定,但由于该区序列的保守性,不适合用于 Gt1 分型。

分析其他基因靶点如 NS5B、core 和(或)core-E1 可以提高基因型和亚型的准确性。即使有这些可选靶点,直接测序基因分型方法的准确性也有限。随着世界范围内丙型肝炎诊断的扩大,变异序列越来越多,使基因型检测结果异常。这些变异序列包括一度罕见的基因型(Gt4、Gt5 和 Gt6)和其他比较常见的变异基因型(Gt1、Gt2 和 Gt3)。与 NS5B 或核心蛋白区的直接测序相比,LiPA 2.0 将 Gt6 误认为 Gt1 或 Gt3 尤其成为问题,因为这可能导致不适当的治疗和治疗失败[7,68]。实时 PCR 旨在单一反应中只检测 Gt1 和 Gt6,并提高了对这些基因型之间的识别(雅培 HCVGenotype Ⅱ PLUS RUO;雅培分子,Des Plaines, IL),虽然已经减少了 Gt6 的误认但并没有消除[69-70]。Sanger 测序显示为 Gt6、Gt2 和 Gt3 的不确定结果也被观察到,必须通过另一种检测来解决[68,71-72]。考虑到 HCV 基因组序列具有很大的多样性,依靠序列结合来判断基因型的检测可能永远无法达到与基于不确定序列的化学检测如测序相同的准确性水平。已经发表了多种

HCV 基因型测定的测序方法(表 94-6)。表 94-7 列出了不同基因型测定方法的优缺点。值得注意的是,重组丙型肝炎病毒株可以通过检测 5′区(5′UTR、核心蛋白、E1)和 3′区(NS5A 和 NS5B)的方法进行鉴定,如多靶点测序或全基因组测序(whole-genome sequencing,WGS)方法。目前的商品化测试尚不能检测出这些变异(表 94-7)。

表 94-5 商品化 HCV RNA 基因型分型检测[a,b]

试验	方法	靶点	亚型	说明	参考文献
eSensorHCV 基因型分型检测(杰马克)[c]	寡核苷酸探针的捕获扩增;电化学检测二茂铁标记的寡核苷酸探针信号	5′UTR	不是	适合使用罗氏 CobasAmpliprep/CobasTaqMan PCR 扩增;由于 5′UTR 保护分型不可靠	104
通用 HCV 基因型(利帕)2.0(西门子)[d,e]	反向杂交检测条带(线性探针);自动化印迹处理器和带解释说明的可使用仪器	5′UTR 和核心基因	是	据报道有效区分 Gt2 和 Gt4 亚型仍有些困难。与 1.0 版本相比,使结果解释复杂化的 Ghost 频带出现的频率更低(A. Caliendo, personalcommunication)	105-106
实时 HCV 基因型 Ⅱ(雅培)[c,f]	实时荧光定量 RT-PCR	NS5b(Gt1a 和 Gt1b),5′UTR(Gt1~Gt5)	是	96%的基因分型与 LiPA2.0 和基于 NS5B 的直接测序结果一致	107
cobas HCV GT[c](罗氏)	实时荧光定量 RT-PCR	5′UTR、核心蛋白和 NS5B	仅有 Gt1a 和 1b		108
Sentosa SQ HCV 基因分型检测(Vela 诊断)[f]	大规模平行测序(NGS)	NS5B	是	平台结合核酸提取、文库构建、模板制备、测序(离子激流技术)和序列分析。LIS 连接	109

注:[a] 下一代测序(next-generation sequencing,NGS);实验室信息系统(laboratory information system,LIS);[b] 基因型 1-6 可以用所有的检测方法确定;[c] 可在全球范围内仅作为研究使用的产品;[d]CE 标记和参照欧洲体外诊断指南 98/79/EC,经美国 FDA 批准使用;[e] 美国 FDA 已经批准了 Gt1-Gt5 的检测,但没有批准 Gt6 的检测,在美国以外市场销售的版本可用于测定 Gt1-Gt6;[f]CE 标志和参照欧洲体外诊断指南 98/97/EC

表 94-6 实验室研发的 HCV RNA 基因型分型方法

试验	化学	靶点	基因型分型	亚型	参考文献
测序	Sanger 化学	NS5B,core,core-E1	1~6	是	110-112
测序	大规模平行测序(也称为下一代测序和深度测序)	全基因组,NS5B	1~6	是	113-116
亚型特异性 PCR	PCR 亚型特异性引物;通过凝胶电泳检测不同大小的扩增产物	Core,NS5B	Gt1a,Gt1b,Gt2a,Gt2b,Gt3a,Gt3b,Gt4,Gt5a,Gt6a	是	117-118

表 94-7 HCV 基因分型检测方法的优势和不足[a]

LiPA 和实时 PCR

优势

- 技术上比较简单
- 使用常用的设备
- 劳动力需求低
- 低成本

不足

- 准确性问题:基因型误判和不确定性
- 结果:不能识别重组病毒株

（续 表）

测序技术(Sanger,MPS)
优势
• 精确度黄金标准
• WGS:可以同时获得基因型和耐药序列数据
• 可以识别重组变异
• WGS:重组变异鉴定的金标准;可检测遗传断点
• 基因靶向 Sanger 测序法:需要测序 5 端'(5'UTR,core,E1)和 3'端(NS5A,NS5B)基因组靶点识别重组 HCV 病毒株
• 基因靶向 MPS 方法:需要读长技术(long-read technologies)识别重组 HCV 病毒株
不足
• 所有方法:基础设备需求(仪器、信息学);成本
• 宏基因组 MPS(血浆中所有无偏差测序 RNAs):由于人类(宿主)序列读取背景高,其覆盖深度低于(即较少 HCV 特异性读取)包括测序前富集步骤(HCV RNA 捕获,HCV 特异性 PCR)的方法[119];与基因靶向方法(4.0 log_{10} U/ml)相比,需要比基因靶向方法更高的 HCV RNA 水平(>4.0 log_{10} U/ml)[89]

注:[a] 线性探针杂交(line probe assay,LiPA);大规模平行测序(massively parallel sequencing,MPS),也称为下一代测序或深度测序

对于已获得监管部门批准的测试,实验室必须内部验证测试结果的准确性。实验室研发的试验需要更广泛的分析验证。从准确性的角度来看,比较常见的病毒的基因型(Gt1~Gt3)测定相对简单,因为这些样本很容易获得。Gt4、Gt5 和 Gt6 相对不常见,因此问题更多。目前已有商品化的 HCV 样本可用于实施前的准确性研究,如 Gt1~Gt3,ProMedDx,Norton, MA;Gt1~Gt5, Exact Diagnostics, Fort Worth, TX;Gt1~Gt6, BocaBiolistics, Coconut Creek, FL 和 SeraCare, Milford, MA。如果发现样本中含有此类不太常见的基因型,可将样本送往参考实验室进行基因型鉴定。

九、血清学试验

HCV 感染的诊断通常是通过采用血清学试验(图 94-3)。除了在以往的 HCV 筛查建议中基于风险的检测外,新的筛查建议包括对 1945 年至 1965 年出生的人同时进行血清学试验[73](表 94-8),该人群慢性丙型肝炎患病率最高。之所以推荐出生队列筛查方案是因为以前筛查建议不能有效确定究竟哪些人群是慢性期感染的人群。

表 94-8 慢性期丙型肝炎筛查的建议[a]

具有以下风险因素的个体也应进行血清学检查	监禁
注射吸毒(最近或以往;单次或多次)	不明原因的转氨酶升高
与丙型肝炎流行相关的情况	1992 年以前有输血或器官移植者
1945 年至 1965 年出生	感染 HCV 母亲所生的孩子
HIV	针刺伤或黏膜暴露于 HCV 阳性血液者
在 1987 年以前输过凝血因子的血友病患者	丙型肝炎病毒感染者的性伴侣
血液透析者	

注:[a] http://www.hcvguidelines.org

HCV 血清学试验经历了重要的发展进程。在确定了 HCV 为非甲非乙型肝炎的主要病原体后,很快在 1990 年研发出了首个含有单一 NS4 肽段(c-100-3)的第一代血清学试验方法。该方法曾体现出重大进步,特别是在确定血液制品的污染和防止丙型肝炎的输血传播方面,但其很快就表现出敏感性和特异性较低的缺陷(敏感性 70%;阳性预测值在低流行率和高流行率人群中分别为 30%~50% 和 70%~85%)[74]。第二代血液筛查试验引入了 NS3 抗原和核心抗原,使敏感性和特异性得到了提高(其中一个仍在销售),见表 94-9 和图 94-4。这 2 个靶抗原可引起早期的抗体应答反应,因此能够更好地发现急性期感染。加入 NS5 和重组 NS3 抗原(图 94-4)的第三代血液筛

查检测性能提高的原因尚不清楚。对是否通过加强 NS3 抗原性来提高血清学转换早期识别，一直存在争议[75]。然而，在超过 6 个月的时间内 HCV RNA 阳性献血员第三代检测结果持续阳性而第二代检测结果为阴性，这说明有更复杂的免疫因素参与其中[76]。

表 94-9　抗 HCV 抗体检测血清学试验[a]

试验(制造商)	检测类型	S/CO 值[b]	敏感性(%)	特异性(%)	获批用于献血筛选	参考文献
雅培 HCV EIA2.0(雅培)	酶免疫分析法	≥3.8	85.6	98.4	是	120
AxSYM Anti-HCV(雅培)	微粒子免疫分析法	≥10.0	100[c]	94[d]	不是	试剂说明书
Architect Anti-HCV(雅培)	化学发光微粒子	≥5.0	99.7[c]	97.7[d]	不是	试剂说明书
Abbott Prism HCV(雅培)	化学发光免疫分析法	不适用[e]	100	100	是	试剂说明书
Ortho HCV version 3.0 EIA(强生)	酶免疫分析法	≥3.8	96.9～100	100	是	121
VITROS Anti-HCV(强生)	化学发光免疫分析法	≥8.0	100	96.5～98.1	不是	122,123
Elecsys Anti-HCV Ⅱ(罗氏)	电化学发光免疫分析法	≥10.0	100	99.8	不是	124-126
Advia Centaur HCV(西门子)	化学发光免疫分析法	≥11.0	100	99.9	不是	127

注：[a] 所有试验由美国 FDA 批准用于诊断；[b] >95%S/CO 值超过阈值的样品预示着确认试验是阳性；[c] 产品说明书中以百分比阳性符合率表示；[d] 产品说明书中以百分比阴性符合率表示；[e] 不适用(not available，NA)

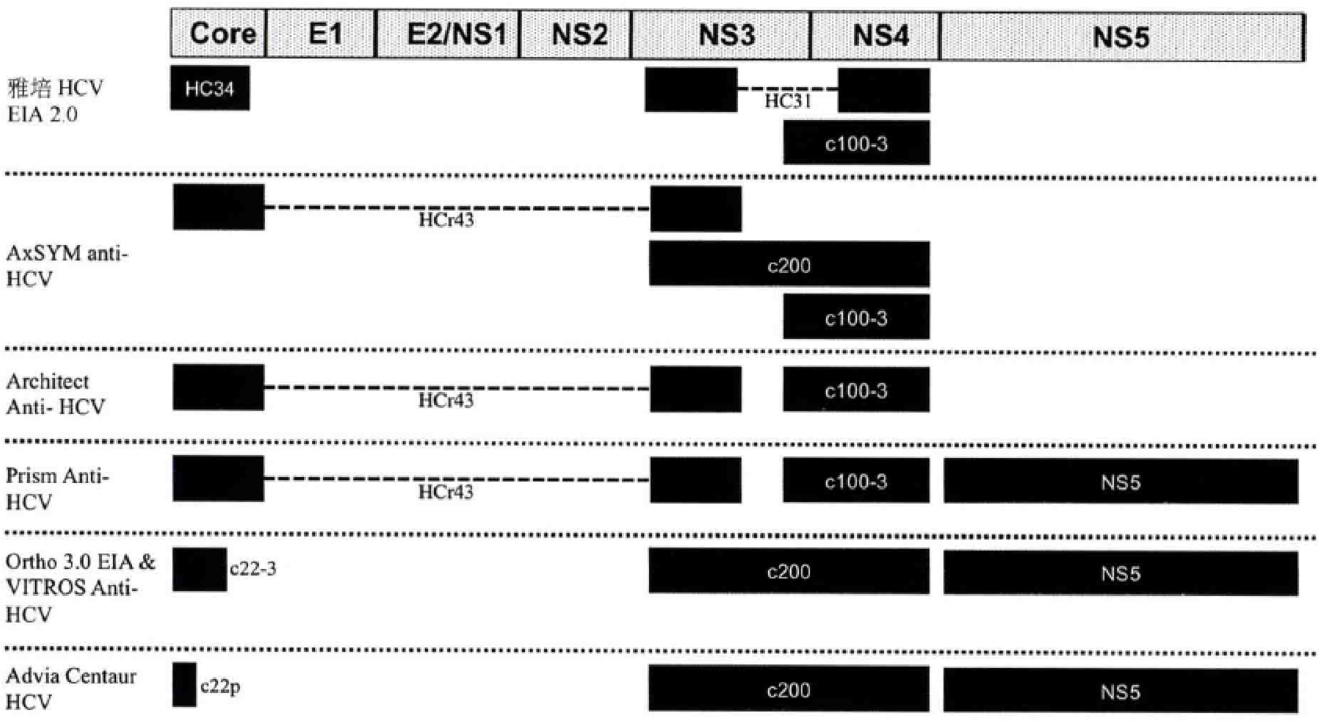


图 94-4　目前在美国可用的商品化血清学试验的抗原。雅培 HCV EIA2.0 是目前唯一可用的第二代筛查试剂。AxSYM，Architect，Ortho 3.0 EIA，Ortho Vitros 和 Advia Centaur 是第三代 HCV 抗体筛查试剂。HC34. 含有 HCV 核心蛋白的重组抗原[氨基酸(aa)1-150]；HC31. 含有 NS3(aa1192-1457)和 NS4(aa1676-1931)的重组抗原，由 8-aa linker 分隔开；c100-3. 含有 NS3-4(aa1569-1931)的重组抗原；HCr43. 2 个非连续性抗原的融合蛋白，c33c 和核心蛋白(aa1-150)；c200. 含有 NS3-4 的重组抗原(aa1192-1931)；NS5. 重组抗原(aa2054-2995)；c22-3. 含有核心蛋白的重组抗原(aa2-120)；c22p. 含核心蛋白主要抗原表位的多肽(aa10-53)。对于电化学发光法测抗 HCV Ⅱ仅多肽位置显示，准确识别属专利信息

用血清转化模式只能从血清学角度解释感染,引进第一代、第二代和第三代血清学试验可将血清转化窗口期分别缩短至约 16 周、10 周和 8 周。值得注意的是,当采用核酸检测确认感染时,使用第二代和第三代血清学筛查试验检测血清转换窗口期就长多了[58,77](图 94-2)。表 94-9 提供了在美国获批用于 HCV 血清学筛查和诊断试剂信息;许多其他检测试剂也可在全球范围内使用[78]。美国 FDA 批准了一种快速(20~40 min 出结果)、即时的、直接从样品盒中提取的免疫层析测试(CLIA-waived),用于指尖和静脉穿刺全血(OraQuickHCV, OrasureTechnologies, Bethlehem, PA)。与第三代血清学试验相比,报告的敏感性为 94%~99%,特异性为 99%[79-80]。

虽然产品性能特性得到了改进,但仍然会出现错误的血清学结果。第二代产品仍然在用(雅培 HCV EIA 2.0,表 94-9),由于其敏感性低于第三代检测,可能会产生假阴性结果。因此,在适当的临床环境中(例如,突发肝炎患者或诸如来源于 HCV 感染者的针刺伤职业暴露),对第二代基因检测结果阴性的患者可以考虑采用替代试验(第三代血清学试验或核酸检测)。如果怀疑为急性丙型肝炎(见"评估、解释和急性丙型肝炎结果的结果报告/结果的解释",下面将进一步讨论),任何阴性的血清学试验结果都可以考虑采用替代试验。在免疫功能低下的患者已经观察到假阴性结果(HIV 且 CD4<100,化疗的肿瘤患者),应采用核酸检测明确地排除患者的感染[60,81]。

对于大多数的抗体筛查试验来说,首次检出阳性结果后还需再次复检,如果 2 次或多次复检结果是阳性的应报告为阳性。一些化学发光和微粒子免疫检测试剂,如 AxSYM Anti-HCV(雅培)、Architect anti-HCV(雅培)、VITROS Anti-HCV(强生)、Advia Centaur HCV(西门子),其优势之一就是初检阳性结果即可报告为阳性,因为这些检测的敏感性、特异性高,不需要再对样本进行复检。

HCV 血清学试验最初是作为筛查试验,强调了敏感性却导致了潜在的假阳性结果。因此既往提议[82],为避免误诊,在进行核酸检测之前用重组免疫印迹法(recombinant immunoblot assay,RIBA)来确证所有的阳性结果。血筛领域之外的临床医生或检验人员并不认为所有初筛阳性结果需重新确证,因为核酸检测更具确诊作用,而 RIBA 并不适合作为确证试验,因为它所用的抗原与抗体筛查试验中的抗原是一样的。后来的建议包括一个复杂的流程(complex algorithm)并建议采用 RIBA 对低信号/cutoff 值(S/CO)筛查结果的确证,因为在这些样本中更容易产生假阳性[83]。现在 RIBA 不再生产,慢性丙型肝炎筛查流程(图 94-3)已大大弱化了确证试验的概念,除非怀疑一个没有风险因素个体的假阳性结果。在这些情况下,S/CO 值虽然没有被正式提及,但仍然有助于指导其他检测(用于美国和欧洲的方法见表 94-9;其他方法的 S/CO 值详见参考文献[84]);通常低 S/CO 值提示血清学结果为假阳性。如果需要假阳性筛查结果的文件,美国指南推荐使用 FDA 批准的 HCV 抗体筛选试验[85]。在其他国家,商品化 HCV 免疫印迹是可用的(INNO-LIAHCV 评分,Fujirebio;CE 标记)。

十、抗病毒药物敏感性

目前,有一些与 DAA 治疗失败相关的 RASs 基线测试,存在一定的临床实用性。HCV 在感染者体内以准病毒株(quasispecies)形式存在,这与病毒 RNA 基因组依赖容易出错的 RNA 依赖 RNA 聚合酶进行复制有关。RASs 常见于未治疗个体的准病毒株中。

与其他病毒感染(HIV)不同的是,基线 RAS 基因的存在并不能统一的预测治疗失败。当然,在 HCV 基因型和 DAA 给药方案的特定组合中,某些基线 RASs 与治疗失败相关。此外,在设定基线 RAS 时,前期治疗失败(含干扰素 α 方案)和潜在肝硬化的存在可能进一步导致治疗失败。因此,包括治疗方案、HCV 基因型、潜在肝硬化和治疗经验在内的多种因素被用来确定是否有必要进行基线 RAS 检测,并在确定重要 RASs 时调整治疗[86](http://www.hcvguidelines.org)。

目前,基线 RAS 检测仅限于 NS5A 基因。在没有 DAAs 的情况下,HCVs 与 NS5A RAS 的复制适应度较高。这些变异在基线和 DAA 治疗停止后的长时间内被检测到[87]。相比之下,RASs 基因存在于 NS3/4A 和 NS5B 基因中的变异病毒,与野生型 HCV 相比,在缺乏药物选择的情况下相对不适合。表 94-10 显示了确定 RAS 基线、

RAS 显著性和确定 RASs 时推荐的治疗修改的临床方案。治疗失败后检测 RAS 无临床实用性；因此，不建议在这种情况下进行测试。

大多数 RASs 改变 DAA 结合位点的构象，因此，当在 HCV 复制子系统中检测时，会导致 50% 最大效价（50% of maximal efficacy，EC50）所需的浓度增加[86]；目前临床可操作的 RASs 会导致高水平的耐药性（在复制子系统中 EC50≥25 倍增加）（http://www.hcvguidelines.org）。有趣的是，并非所有 RAS 位置的替换都同等重要。一些仅仅是多态性，另一些则引起临床显著的耐药性。单一基因的多基线 RASs 可能会对治疗反应产生负面影响。初步数据表明，NS5A 中 3 个或 3 个以上 RASs 与未接触过 NS5A 抑制剂的 Gt 1b 感染患者的雷迪帕韦/索非布韦（ledipasvir/sofosbuvir）失败相关[88]。需要更多的数据来更好地理解这一现象的临床意义。

表 94-10　治疗开始前 RAS 检测建议[a]

基因型	药物组合	治疗		NSB5 检测	临床相关替代	注释
		Naïve	经验			
1-6	Glecaprevir/pibrentasvir	X	X	否	—	治疗时间 8、12、16 周
1a	雷迪帕韦/索非布韦	X		否	—	无肝硬化，治疗前 8 周 6×10^6 U/ml
			X	是	Q30H/R，L31M/V，Y93C/H/N	无肝硬化，如果倍耐药性>100 倍，治疗 12 周加利巴韦林（或使用不同的治疗方法）
1b		X	X	否	L31V	无肝硬化，治疗前 8 周 6×10^6 U/ml
1a	艾尔巴韦/格拉瑞韦	X	X	是	M28A/T，Q30H/R，L31M/V，Y93C/H/N	如果存在，延长至 16 周（或考虑不同的治疗）或有肝硬化 24 周
1b					Y93H	
3	达拉他韦/索非布韦	X		否	—	
			X	是		治疗前无肝硬化 12 周（或肝硬化 24 周）。Y93H，加利巴韦林
3	索非布韦/velpatasvir				Y93H	经验治疗（1/2 肝硬化）和初次治疗的肝硬化考虑 12 周索非布韦/velpatasvir。Y93H，加利巴韦林
1-6	索非布韦/velpatasvir/voxilaprevir	X	X	否	Y93H	不推荐治疗 12 周

注：[a]http://www.hcvguidelines.org

测序是 RAS 检测的首选诊断方法（http://www.hcvguidelines.org，http://www.easl.eu/_clinical-practice-guideline）。仅当血浆中存在≥15%的 HCV 准病毒株时，发现 RASs 与治疗失败有关；低频率出现的微小变异似乎不影响治疗结果（http://www.hcvguidelines.org，http://www.easl.eu/_clinical-practice-guideline）。因此，Sanger 测序化学适合于基线 RAS 测定，因为它可以识别至少有 10%～20%准病毒株存在的遗传变异。大规模并行测序（也称为深度测序或下一代测序）也可用于 RAS 检测。治疗指南建议，只有在读取序列≥15%时才报告替换（http://www.hcvguidelines.org，http://www.easl.eu/_clinical-practice-guideline）。商品化检测仅限于大规模平行测序（Sentosa SQ HCV 基因型分析，Vela 诊断），该测试针对 NS3、NS5A 和 NS5B 中的区域进行 RAS 识别。

文献中已经报道许多不同的检测 RAS 非商业测序方法。当从已发表的 Sanger 或大规模平行测序方法中实现目标特异性试剂时应谨慎，因为许多引物是基因型特异性的。预期 RAS 识别的功效，临床相关的基因型应该建立在测试验证的基础上。理论上，WGS 会有针对性的技术避免基因型的包容性问题。这种方法是不切实际的，因为 RAS 检测目前是低容量常规实验室测试且 WGS 只在高容量/高通量配置下才具有成本效益。最近的一项 meta 分析使用了已发表的测序方法的敏感性（在 HCV 水平≥1000 U/ml 的标本

中识别 RAS 的能力)和基因型包容性等标准,这对潜在的测序试剂是一个有用的资源[89]。

在使用含干扰素 α 的治疗方案开始前,IL28B 基因单倍体试验是检测干扰素 α 耐药宿主遗传标记的重要手段。目前,在使用无干扰素联合 DAA 方案治疗前,对 IL28B 单倍型的检测还没有临床应用。该试验的应用可能有限。

十一、结果的评价、解释和报告

(一)急性丙型肝炎结果的解释

对急性丙型肝炎的确诊富有挑战性。多数急性丙型肝炎患者无临床症状。因此,如果存在血清转氨酶升高可能有助于诊断,但不应该作为唯一的感染指标。此外,血清转换可能会延迟并间歇的在血浆中检测到 HCV RNA。同时进行血清学指标和病毒 RNA 检测才可以获得理想的感染检测结果。诊断准确性需要进行多个时间点检测。单次 HCV 核酸检测结果无法可靠预测暴露情况。慢性感染者早期感染后的血清转换期可出现短暂的 HCV RNA 阴性[90](图 94-2)。自发清除病毒的患者中也会出现暂时的阳性结果[58,91]。在已知暴露 6 个月后建议进行感染检测,因为在这段时间大部分患者都出现血清学转化(http://www.hcvguidelines.org)。暴露后应尽快进行初步检测,以确定暴露时的 HCV 感染状态。在 6 个月的时间里,如果没有 HCV 感染的前期证据,应该每 4~6 周检测 1 次 HCV NAAT 和血清学试验,或者只有在有 HCV 感染的前期证据时才检测 HCV NAAT (HCV 血清学阳性,未检测到 HCV RNA)。暴露后的 6 个月期间,检测到 HCV RNA 2 次,至少间隔 12 周,被认为是进展为慢性感染的证据(http://www.hcvguidelines.org)。

(二)慢性丙型肝炎结果的解释

干扰素 α/利巴韦林作为抗病毒治疗方案的效果不佳,提高了诊断测试(特别是定量 NAAT)在慢性丙肝治疗管理中的重要性,使其成为决定治疗时间和治疗后反应决策的关键。因此,需要充分了解检测的性能特征(基因型偏差、精度和检测限度),以便准确地解释结果,并对患者进行适当的管理。然而在全口服 DAA 时代,检测在治疗管理中的作用非常有限,因为方案是非常有效的。从本质上讲,如果采用正确的治疗方案并按处方服药,患者会对治疗产生反应。在这种情况下,检测解释的问题是微妙的或次要的。对于基线评估,实验室应充分了解其基因分型分析的准确性(包括 Gt1a 和 Gt1b 结果的准确性)及其定量 NAAT 整个测量范围的准确性,因为基因型和 HCV RNA 水平用于选择最佳治疗方案。治疗检测通常局限于评估第 4 周的 HCV RNA 水平。大多数患者此时没有检测到 HCV RNA;因此,在处理监测过程中,影响定量和试验解释的因素影响可以忽略不计。那些在第 4 周检测到 HCV RNA 的患者,通常在第 6 周治疗时出现低水平或极低水平的 HCV RNA。"检测到 HCV RNA,低于定量下限"的结果应解释为 HCV RNA 含量非常低,而不是"未检测到 HCV RNA"。几乎所有患者在治疗结束时都没有检测到丙肝病毒 RNA。大多数复发的患者在治疗结束后 12 周将再次出现 HCV RNA,其水平与基线相似。很少有晚期复发的患者,在停止治疗 24 周后再次出现 HCV RNA。当治疗发生在正在进行的高危行为时,这可能会引起混淆,因为很难区分晚期复发和新感染。基因型检测可以作为解决这一问题的第一步,检测出与原来测定不同的 HCV 基因型表明再次感染。如果在处理后的样品中发现了相同的基因型(或基因型/亚型),则需要进行序列测定(通常是 Sanger 测序),并与预处理和处理后的 HCV 序列进行比较。散发性治疗失败或再感染的临床后果很小,除了医疗费用。考虑到 DAA 方案选择多,很容易进行再治疗,且治愈的可能性仍然很高。

参考文献请扫二维码查阅

第95章 胃肠炎病毒*

XIAOLI PANG, MAREK SMIEJA

(杨滨 译;崔仑标 审校)

一、分类法

(一)轮状病毒

轮状病毒属于轮状病毒属呼肠孤病毒科(表95-1),其中包含10种不同的属。基于主要病毒结构蛋白VP6的群特异性抗原,轮状病毒被划分为7个群(A~G)[1]。群特异性表位被发现出现于其他结构蛋白,如同其出现于一些非结构蛋白中。A~C群轮状病毒感染人和动物,其中A群更经常感染人类并主要在幼儿中引起胃肠炎。B群和C群感染猪,但偶尔在中国(B群)和日本(C群)与食源性或水源性胃肠炎暴发有关。D~G群轮状病毒主要致病动物。在每组中,基于中和试验,使用针对2种主要外壳蛋白(VP4和VP7)的抗体,将轮状病毒进一步划分为不同血清型。VP4是一种位于衣壳表面的刺突蛋白,对蛋白酶裂解敏感;因此,基于VP4蛋白的病毒类型也被称为P型(蛋白酶敏感)。VP7是一种糖蛋白,基于这种蛋白的病毒类型也被称为G型。P型和G型也都按照VP4和VP7基因序列划分为不同基因型。2008年,一项新的分类系统受到推荐,由分子病毒学、感染性疾病、流行病学和公共卫生等专家组成的轮状病毒分类工作组成立并协助划分新的基因型。科学家发现含有11种基因片段中任一片段的潜在新型轮状病毒基因型,便会受邀将新的序列发送到轮状病毒分类工作组,在那里将对序列进行分析,并将适当地推荐新的命名。迄今为止,已报道27个G基因型和37个P基因型[2-3]。基因型G1P[8]、G2P[4]、G3P[8]、G4P[8]和2012年新出现的G12P[8]在北美最常见。在世界不同地区,随着地理位置的改变,基因型也随之改变。

表95-1 主要的肠胃炎病毒分类和病毒学特性

病毒	家族	大小(nm)	电镜下的形态	病毒基因组	遗传或抗原类型
轮状病毒	呼肠病毒科	70	轮状,三分层衣壳	分节段的双链RNA	7种抗原(A-G)和27G和37P型
诺如病毒	杯状病毒科	30~38	小圆结构病毒	线性单股正链RNA	5种基因群,14种GI和29种GII
札幌病毒	杯状病毒科	30~38	小圆结构病毒,外表类似大卫之星	线性单股正链RNA	5种基因群,14个类型
肠腺病毒	腺病毒科	70~100	二十面体衣壳	线性双链DNA	人肠腺病毒40和人肠腺病毒41
星状病毒	星状病毒科	28~30	小圆结构病毒5,6个角的星形	线性单股正链RNA	8种血清分型

(二)杯状病毒

杯状病毒属于杯状病毒科(表95-1),是一组多样化的人类和动物病毒,包含5种明确的种属,诺如病毒(曾名诺瓦克病毒)、札幌病毒(曾名札幌样病毒)、纽伯病毒、兔病毒和水疱疹病毒及4种新建议大类:博卡病毒、Nacovirus、Recovirus和Valovirus[4-5]。杯状病毒中,诺如病毒和札幌病毒主要感染人类并引起胃肠炎。在每一种属中,病毒株进一步分为基因组(G)和基因型或簇。诺如

*本章包含Xiaoli Pang和Richard L. Hodinka在本手册第11版第93章中呈现的部分内容

病毒分为5种基因组(GⅠ～GⅤ),其中GⅠ、GⅡ和GⅣ主要感染人类,GⅡ和GⅢ可感染猪和牲畜,GⅤ感染老鼠[6]。基于在可读框1(ORF1)和ORF2的序列变异,至少GⅠ的14种基因型和GⅡ的29种基因型已报告[7]。诺如病毒的一种单一基因型[Ⅱ基因组,4基因型,(GⅡ.4)]在过去的10年中最为流行,在许多国家中,占所有诺如病毒引起的胃肠炎中的比例高达80%[8]。GⅡ.4已证实比其他病毒株具有更快的进化能力,其新的簇或变体每2～5年出现;最新的变异体,称为"悉尼病毒株",在2012年引起全球暴发流行[9-11]。在GⅡ.4流行十多年后,诺如病毒的基因型与其进化的历史数据相比,近来发生了重大的变化。自2012年以来,观察到GⅡ4相关胃肠炎的暴发逐渐降低,与此同时,诺如病毒及4种新出现毒株的遗传多样性增加,包括2014年在中国首次报告的GⅡ.17 Kawasaki[12]、2015年在韩国报道的GⅡ.P16/GⅡ.4悉尼[13],GⅡ、2016年在澳大利亚[14]报道的P4新奥尔良/GⅡ.4悉尼株,以及2016年在德国[15]报道的GⅡ.P16/GⅡ.2。这些新的GⅡ毒株迅速在全球传播,在各个大陆都有报道。

类似于诺如病毒,札幌病毒在5个基因组中分为14种基因型[16-17]。GⅠ、GⅡ、GⅣ和GⅤ感染人类,GⅢ感染猪[16]。

(三)肠道腺病毒

人类腺病毒(human adenoviruses,HAdVs)是腺病毒科家族成员(表95-1),分为7个种(A～G)。不同的种感染组织位置不同,而且引起的临床症状也不同;F种已明确与胃肠炎相关。最近,人类腺病毒工作组提议使用全基因组序列分析来描述和命名人类腺病毒,以"型"取代"血清型",以纠正过去按照血清学分类的错误方法,即仅仅对六邻体基因的2个小的保守区域进行的血清中和反应和血凝抑制反应来进行分类[17-18]。基于血清学试验,全基因组测序和种系基因组学,现有68种人类腺病毒[18-20]。许多腺病毒可以轻易地从人类粪便中分离,但其在引起急性胃肠炎中所扮演的角色不明。尽管如此,仍有2种类型,F种的AdV40和AdV41,与婴儿腹泻明确相关,并被归为肠道腺病毒(EAdVs)。这类肠道腺病毒也被称为"苛养腺病毒",因其在细胞培养中很难生长。最近,其他人类腺病毒类型,即G种的HAdV-52和D种的HAdV-67,被认为可能引起胃肠炎[20-21]。

(四)星状病毒

星状病毒属于星状病毒科(表95-1),如此命名是因其特征性的似星的表面结构(astron在希腊语中意为星星)。星状病毒的2个属,哺乳动物星状病毒属和禽星状病毒属,是根据其宿主种类来描述;前者感染哺乳动物,后者感染鸟类[22]。在每一个属中,有多种星状病毒是根据其感染的宿主来命名。人类星状病毒基于抗原和基因分型划分为八种类型[23]。一型最常见,但全世界范围这八种类型都能被检测到。

(五)其他引起胃肠炎的病毒

其他引起人类急性胃肠炎的肠道病毒包括冠状病毒和环曲病毒,冠状病毒科的2个属[24],小核糖核酸病毒科嵴病毒属的爱知病毒[25],小双节核糖核酸病毒科的小双节核糖核酸病毒[26],以及微小病毒科博卡病毒属的人博卡病毒[27]。上述病毒的详细讨论不在本章范围。

二、病原体描述

(一)轮状病毒

轮状病毒无包膜,是为数不多的具有分段双链RNA基因组的人类病毒(表95-1)。成熟的轮状病毒颗粒直径约为70 nm,形状看起来很像轮子(拉丁文中"rota"的意思即为"轮状"),病毒颗粒为3层二十面体蛋白衣壳结构,分为外层,中间层和内层。其双链RNA基因组包含有11分段,并且依照分子由大到小从3300 bp到660 bp依次编号为1～11,每个分段即为一个基因,可编码一种蛋白,其基因组11个分段的编码产物现已明确:包括成熟病毒颗粒上的6个主要的结构蛋白(VP1、VP2、VP3、VP4、VP6和VP7)和另外6种非结构蛋白(NSP1～NSP6),后者主要表达于感染细胞中,在病毒基因组的复制、蛋白合成、衣壳的组装及成熟中发挥着重要的作用。其中,VP4和VP7位于病毒核衣壳的外层,VP6位于中间层,而VP2和一个由VP1和VP3组成的聚合酶复合物位于最内层。非结构蛋白之一的NSP4被认为是一种病毒性肠毒素[28]。与流感病毒类似,

轮状病毒菌株具有节段基因组可以发生基因重组，导致其可能形成新的病毒类型。

(二)杯状病毒

杯状病毒，无包膜，是直径 30～38 nm 的小圆结构病毒，具有单股正链 RNA 基因组(表 95-1)。札幌病毒具有典型的杯状病毒的形态，病毒的表面呈杯状凹陷形似“大卫之星”(六角星)(calyx 在拉丁文中意为杯子)。诺如病毒表面结构较为光滑，因此又被称为“小圆结构病毒”[29]。通过低温电子显微镜和 X 射线晶体学分析重组病毒样颗粒(virus-like particle，VLP)显示，诺如病毒衣壳为一个二十面体结构(T=3)，它由 180 个蛋白质形成的 90 个二聚体衣壳结构组成。每一个衣壳蛋白包含两个主要的结构域，即外壳结构域(S)和突出结构域(P)。其中，在大肠埃希菌中表达突出结构可自我组装成亚病毒颗粒，即 P 颗粒，其保持了诺如病毒颗粒的受体结合和抗原识别的属性[30]。P 颗粒高度稳定且易于合成，目前认为其可作为潜在的诺如病毒亚单位疫苗。诺如病毒的 RNA 基因组全长 7.5 kb 且具有 poly A 尾，可分为 3 个可读框(ORFs)，其中，ORF1 编码非结构蛋白，ORF2 编码 VP1 衣壳蛋白，ORF3 编码微小结构蛋白[31]。札幌病毒基因组略微不同的地方是其编码非结构蛋白和衣壳蛋白的基因集中于一个大的可读框。

(三)肠道腺病毒

腺病毒的命名源于希腊语 aden，意思是“腺”，由于它最初是从腺样组织中分离所得，故又被称为“腺相关病毒”。人腺病毒与很多疾病有关，包括呼吸系统疾病、结膜炎和痢疾[32]。腺病毒无包膜，直径为 70～100 nm，呈二十四面体(表 95-1)，成熟病毒体是由一个包含 DNA 的核芯和由六邻体、五邻体及纤维蛋白组成的外围衣壳构成(图 95-1)。其基因组为不间断的线性双链 DNA，种属之间长度为 30～38 kb。衣壳由 252 个壳粒组成，其中含有 240 个六邻体和 12 个五邻体。其共有 11 个病毒结构蛋白，包括上述的六邻体、五邻体基体及纤毛，这些蛋白均具有重要的临床意义，它们与病毒入侵(纤毛)和其在胞内运输均密切相关。纤毛起于病毒衣壳表面，并与宿主细胞上的受体相互作用，对于大多数腺病毒，包括肠道腺病毒，其在宿主细胞表面的受体为柯萨奇病毒 B-腺病毒受体，是一类属于免疫球蛋白家族的跨膜蛋白。另外，六邻体和纤毛也含有主要的中和抗原表位。

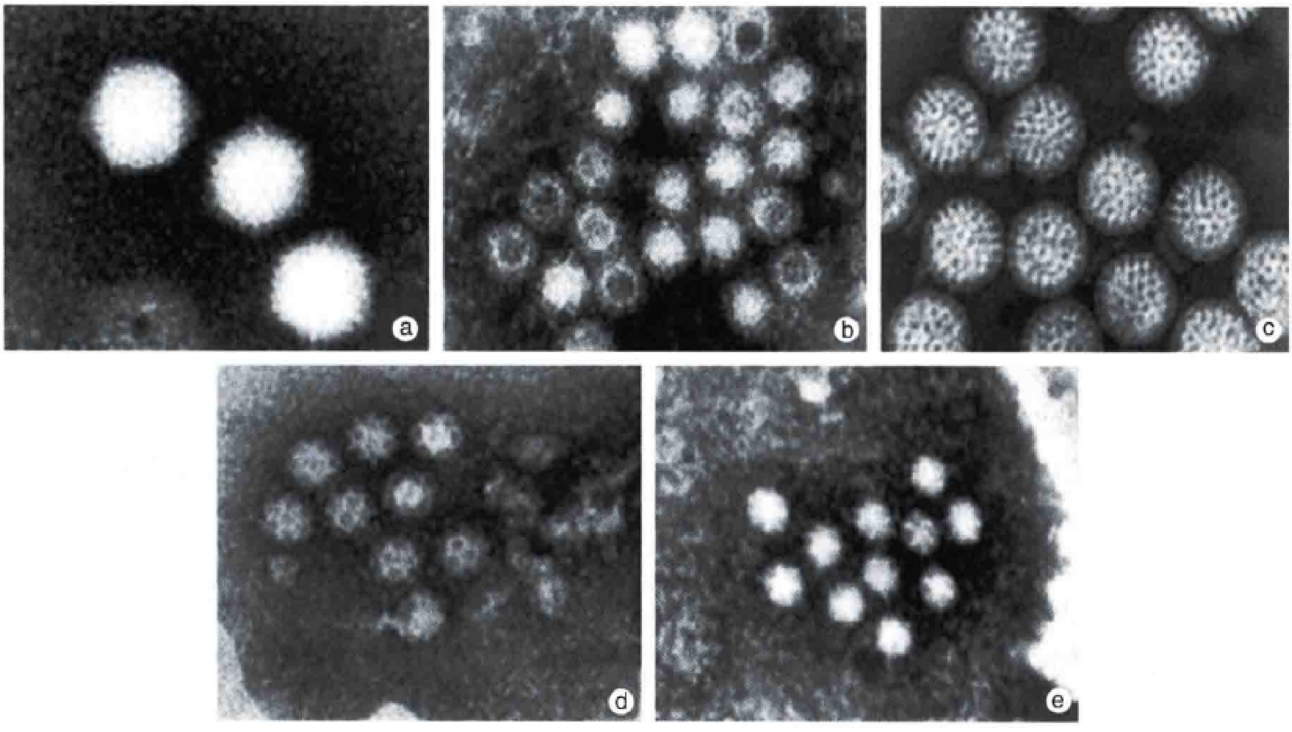


图 95-1 主要胃肠炎病毒的电子显微图

注：a. 轮状病毒；b. 诺如病毒；c. 札幌病毒；d. 星状病毒；e. 腺病毒

(四)星状病毒

星状病毒，较小(直径 28～30 nm)，球形，无包膜，呈典型的星形结构，有 5～6 个角(图 95-1)。经 X 射线晶体学和计算机模拟发现，星状病毒与杯状病毒在结构上相似，但它与戊型肝炎病毒的结构更为相似。星状病毒基因组为单正链 RNA，长约 6.8 kb(表 95-1)，包含 3 个可读框(ORFs)，其中，ORF1a 和 ORF1b 编码非结构蛋白。ORF1a 含有一蛋白酶模体(motif)、跨膜螺旋、核定位信号和核糖体移码信号，而 ORF1b 含有 RNA 聚合酶基序。ORF2 编码衣壳前体蛋白，大小约 87 kDa，且经进一步裂解成 25～34 kDa 的小肽参与成熟的病毒颗粒的形成。

三、流行病学和传播

病毒性胃肠炎在各年龄组、社会各阶层及世界各地均有流行。其中重要流行病学的特征包含年龄、季节、症状持续时间、疾病的严重性和暴露，以及疫苗接种史(表 95-2 和表 95-3)。它的发病年龄一般在 5 岁以下的儿童，其发病高峰出现在 6 个月到 2 岁以内的儿童中。50%～90%的急性病毒性胃肠炎需要住院治疗，且住院天数占该年龄组所有儿科患者住院天数的 3%～10%。

表 95-2 主要胃肠炎病毒的传播和流行病学

病毒	传播方式	目标人群	流行特征
轮状病毒	粪口途径；呼吸？食物和水？	5 岁以下儿童(发病高峰 6 个月至 2 岁)	温带气候秋冬季节；热带地区全年
诺如病毒	粪-口途径；食物，水，呼吸？	所有年龄组	冬季为发病高峰；在一些公共机构全年都可出现暴发
札幌病毒	粪-口途径；呼吸？	主要是儿童(主要是婴儿和幼儿)，成人中少见	全年都有散发疾病；可出现暴发流行
肠腺病毒	粪-口途径；呼吸？	主要是婴儿和 5 岁以下的儿童	全年都有散发疾病；可出现暴发流行
星状病毒	粪-口途径；水，呼吸？	主要是幼童	全年都有散发疾病；可出现暴发流行

表 95-3 主要胃肠炎病毒临床特征

病毒	临床意义	潜伏期(天)	呕吐(天)	腹泻(天)	排出病毒(天)
轮状病毒	急性严重脱水性肠胃炎，医源性感染，可发生隐性感染	1～2	2～3	5～8	8～10
杯状病毒	诺如病毒：中度到重度急性肠胃炎医源性感染，免疫受损患者病毒排出时间延长和慢性疾病，可发生隐性感染	1～2	0.5～1.0	1～2	1～21
腺病毒	札幌病毒：轻度至中度肠胃炎，可发生隐性感染中度到严重的肠胃炎，医源性感染	8～10	2～3	4～12	8～13
星状病毒	在免疫功能低下患者中持续感染轻度至中度肠胃炎，可发生隐性感染	1～2	1～4	1～4	8～10

其散发病例和暴发流行在健康的成人、老年人群和免疫抑制患者中均有报道。胃肠炎病毒可通过粪-口途径传播，通过密切接触感染的患者或间接的接触患者的污染物(如共用餐具、公共环境表面，以及游戏室等)都可能被感染。肠道病毒传播速度快是因为其本身在不同的环境中都有很强的抵抗力，病毒颗粒可大量的通过粪便排出，而感染只需要很低的剂量[33]。肠道病毒高度稳定，在广泛的 pH 和温度范围内，甚至经过干燥、加热或冰冻，其仍然可以在人手上或无生命体上存活很长时间。某些病毒，特别是诺如病毒，通过食用或饮用受污染的食品或饮料而迅速传播，通常导致疾病大暴发。食品污染大多是因为调制者或生产者本身患有病毒性肠胃炎，水和贝类食物通常是因受到污水的污染，而食用生的或未煮熟的贝类或引用被污染的水都可能会引发疾病。肠病毒也被认为可以通过呼吸道分泌物传播，但这一点尚未完全被证实。大多数病毒性腹泻的暴发流行，在发展中国家和发达国家中均造成了重大疾病负担。杯状病毒，特别是诺如病毒，也能引起急性肠胃炎流行，已经成为一个重要的公共卫生问题。温带气候的国家，病毒性肠胃炎没有典

型的夏季发病高峰反而其大多数肠胃炎是由细菌或寄生虫引起。相反，病毒性肠胃炎在寒冷的季节更为常见，具有典型的冬春发病高峰现象。肠道病毒的院内感染，特别是轮状病毒和诺如病毒，较为常见，但尚缺乏切实可行的预防和控制感染的措施。

(一)轮状病毒

在广泛接种疫苗之前，轮状病毒是引起婴儿和2岁以下儿童严重脱水腹泻的主要原因，也是导致发展中国家儿童死亡的一个主要因素。而在发达国家中，轮状病毒感染的病死率要低得多，但在大流行期间，疾病负担也很重，例如，美国每年大约有270万腹泻病例，需要大量的医生出诊和住院治疗，产生大量的医疗和社会成本。婴幼儿通常通过他们有隐性感染的同胞或父母感染疾病。大便中的轮状病毒可出现在疾病发病之前一直持续到腹泻症状消失后。轮状病毒跨物种传播也已经被证实，提示其可能是一种潜在的人畜共患性疾病[34]。

组织血型抗原(HBGA)是存在于肠黏膜的多态性多糖，被认为是轮状病毒感染宿主细胞[35-37]之前的附着配体。HBGA的合成依赖于一组能合成"分泌物"抗原和"Lewis"抗原的酶。轮状病毒和HBGA之间的相互作用是毒株特异性的，在体外和人群的研究中均已观察到了这种现象。例如，P[8]毒株可以感染Lewis阳性和"分泌型"的个体，但不感染Lewis阴性和"非分泌型"个体；P[6]毒株可以感染Lewis阴性个体，而不管他们的分泌状态如何[38-39]。因此，人群的HBGA谱差异可能正好解释了个体在易感性、轮状病毒疾病负担、循环毒株的遗传多样性和疫苗有效性的差异。更重要的是，具有特定HBGA谱的个体比例存在种族差异。例如，在高加索人、非洲人和日本人中，Lewis阳性个体的比例分别为72%、55%和73%，而Lewis阴性的个体比例分别为6%、22%和10%[38,40]。

(二)杯状病毒

诺如病毒具有高度传染性，且无论在发展中国家还是发达国家都被认为是导致非细菌性急性肠胃炎最重要的病原体[41]。同源性暴发和散发均可发生。因为儿童的免疫系统尚不完善或者容易再感染抗原变异的菌株，该病主要在儿童中流行，但各个年龄均可发病。在美国，由于引入轮状病毒疫苗，轮状病毒相关的急性肠炎的病例数显著下降，因此诺如病毒现在已被公认为是导致儿童急性肠胃炎的最主要原因[42]。诺如病毒通常在封闭的社区和各种机构(如医院、托儿所、学校、餐馆、养老院、游船、军事社区和营地等)中造成暴发流行。美国和欧洲各国高度重视诺如病毒在养老院和邮轮中的食源性暴发。免疫功能低下的宿主通常会出现诸如慢性腹泻、病死率增加、病毒从粪便中排出时间延长等现象。近年来，据报道诺如病毒可识别ABH(分泌物)和路易斯组织血型抗原作为受体[43]，因而肠道上皮细胞表达这类受体的个体属于诺如病毒的易感个体，而个体缺乏H1型抗原表位可抵抗诺如病毒的感染。尽管与诺如病毒密切相关的人毒株已经在家畜和野生动物中检测到，但有关诺如病毒在动物间传播的直接证据仍然不足。札幌病毒引起的疾病多发于儿童，其在日托中心和公共机构的散发病例和暴发流行也均有报道。然而，最近发现这些病毒在北美和欧洲成人肠胃炎暴发中也很常见，同时也是实体器官移植受者胃肠炎的常见病因[44-46]。

(三)肠道腺病毒

尽管肠道腺病毒在导致急性肠炎中的作用已得到被广泛认可，但由腺病毒相关的胃肠炎的发病率在不同的研究和不同的区域存在明显的差异，其中平均5%的小儿腹泻中是由肠道腺病毒引起的。肠道腺病毒相关腹泻的暴发流行在医院和日托幼机构中均有报道。人肠道腺病毒的感染，不像轮状病毒和杯状病毒具有典型冬季季节性，全年都有散发病例的发生。跟其他肠道病原菌一样，人肠道腺病毒也经常会在没有胃肠炎的儿童大便中被检测到。多达41%的儿童可能在住院治疗其他病期间导致肠道腺病毒的感染[47]。

(四)星状病毒

人类星状病毒主要引起小儿胃肠炎。在患病儿童的看护人员、免疫功能低下的成年人[48]、军队[49]和养老院[50]均有相关的病例已被报道。根据背景资料和诊断测试，星状病毒的感染与全球范围内2%～10%的儿科胃肠炎有关。无症状的感染在所有年龄段普遍存在，其中学龄儿童血清

星状病毒阳性率为70%～90%，说明儿童时期是最为易感的阶段。

四、临床意义

急性病毒性胃肠炎具有一些特异性的症状和体征，包括发热、腹泻、呕吐、腹部绞痛、敏感易怒、疲倦嗜睡，甚至脱水，其中以轮状病毒性肠胃炎表现的最为严重。尽管诺如病毒、札幌病毒、星状病毒和肠道腺病毒引起的肠胃炎症状比轮状病毒肠胃炎症状要轻，但越来越多的证据显示在因为急性肠胃炎住院的患儿和急诊患者中也经常检测到诺如病毒，可见诺如病毒也能导致严重的肠胃炎[42]。病毒性肠胃炎患者中也出现头痛、厌食症、不适、肌痛、恶心的症状。由于这些病毒性胃肠炎临床症状很相似，因此，想要仅通过临床症状是很难区分是由哪一种病毒引起的胃肠炎。其临床表现差异巨大，有时仅出现单一的某种症状，也有可能几种症状同时出现，也有可能与非感染性的胃肠炎症状相似。总的来说，除了腺病毒以外，引起胃肠炎的多为急性起病，病毒潜伏期为1～2天(表95-3)。疾病的症状持续时间不到7天，大多数患者可通过大便排出病毒，持续时间<1周，但也有可能因病毒和感染宿主的个体差异造成大便更长的时间内都排出病毒。其大便多为水或松散样，没有黏液或血液，且粪便中没有或者只存在少量白细胞。在营养良好、免疫功能正常的个体中病毒性肠胃炎多为自限性疾病，通常仅有轻微的症状或无症状。婴幼儿、老人或免疫力低下者病情一般较重，因其不能及时有效地补充因上吐下泻失去的水分和电解质，从而可导致严重的疾病发生及住院治疗。轮状病毒胃肠炎产生的严重脱水可以引起死亡，这仍然是导致发展中国家婴幼儿死亡的一个重要原因。

轮状病毒、诺如病毒和肠道腺病毒可以在免疫功能低下的个体(例如，经历器官移植、干细胞移植或肿瘤治疗及患有艾滋病的患者)中引发急性胃肠炎和慢性感染。在极少数情况下，这些病毒可以播散至全身并累及其他器官系统[51-58]。然而，由于在临床实践中缺乏对这些病毒的常规检测，免疫功能低下个体的病毒相关疾病负担被低估。越来越多的研究表明，免疫功能低下的个体具有高风险，易患病毒相关性胃肠炎[54-56,58-59]。主要由轮状病毒引起的严重胃肠炎除了影响健康幼儿外，免疫功能低下的成人患者是轮状病毒胃肠炎的另一主要人群，其患病率远高于儿科患者。诺如病毒引起的疾病也可以使免疫力低下的患者变得更虚弱甚至危及生命[60]。诺如病毒是机体免疫力低下的宿主病原之一，在接受同种异体造血干细胞和实质器官移植的患者中，诺如病毒可以引起高达22%慢性痢疾，同时也能延长了粪便排出病毒的时间[56,61-65]。诺如病毒还能引起儿童坏死性小肠结肠炎[66-67]。肠道腺病毒对免疫缺陷个体，如造血干细胞、实体器官移植受者、艾滋病患者和其他免疫抑制治疗患者感染的临床价值越来越受到重视[51,54,58]。腺病毒感染这些个体可以引起轻微的肠胃炎，无症状的感染或者是严重的疾病，包括肠胃炎、肺炎、出血性膀胱炎、肝炎及病死率极高的播散性感染。患者可以在感染数周到数月期间通过大便排出腺病毒。对于这样的临床背景下感染腺病毒的患者其潜在治疗方式包括减少免疫抑制药物，静脉注射免疫球蛋白和静脉内注射抗病毒药西多福韦[68]。目前，尚无特效的抗病毒药物可用于胃肠炎病毒引起腹泻的治疗和预防，临床治疗主要以对症或支持治疗为主，具体治疗包括支持性的护理和补液疗法，在发展中国家，恢复电解质平衡是减少严重脱水患者病死率的最主要的手段。

由于在免疫功能低下的患者中，慢性诺如病毒腹泻的报道越来越多，并因长期感染出现慢性脱水，从而导致严重的并发症，因此减少免疫抑制疗法可能会缓解胃肠炎的症状，但会增加移植物排斥反应的风险[69]。最近的尝试使用免疫球蛋白和硝唑尼特通过抑制病毒对肠上皮的黏附，并促进病毒从消化道清除及抑制病毒复制来治疗免疫低下患者的慢性诺如病毒胃肠炎[69-71]。

抗轮状病毒药物的缺乏和轮状病毒胃肠炎造成的重大疾病负担是推动轮状病毒疫苗发展的主要动力。经过几十年的研究和一些早期失败的疫苗产品的经验积累，现有2种轮状病毒减毒活性疫苗已在美国被批准使用，同时也正在全球范围内使用。由默克公司生产的“轮达停”(RotaTeq)，3针次的G1-G4和P[8]型的五价牛人重配株疫苗，已于2006年获批准使用，由葛兰素史克生产的“罗特律”(Rotarix®)，2针次的单价减毒人G1P[8]疫苗也已于2008年获批准使用。这2种

轮状病毒疫苗已被证明在儿童中是安全有效的，发现在高收入和中等收入国家中可提供高达80%～100%保护效应，并对任何严重轮状病毒胃肠炎保护效应达到70%～80%。自2013年在英国针对儿童引入罗特律疫苗以来，由于群体免疫力的提高，老年人急性胃肠炎的发病率也有所下降[72]。免疫实践咨询委员会最近更新的有关预防轮状病毒疫苗的指南中就包含使用罗特律和轮达停2种疫苗来进行预防[73]。然而，据报道，在一些低收入国家[74-78]，罗特律和轮达停的有效性都有所下降(范围为39%～49%)。虽然轮状病毒疫苗接种效果下降可能是由于营养不良、一般卫生和合并症等因素，但流行基因型与疫苗涵盖的菌株之间的差异是一个主要考虑因素[79-80]。因此，在全球范围内，特别是在低收入国家，持续监测轮状病毒主要毒株的疫苗有效性和基因型漂移非常重要。

由于诺如病毒导致绝大多数的流行病毒性肠胃炎，因此，研发诺如病毒疫苗和相应的抗病毒药物显得尤为重要。正在开发的诺如病毒疫苗目前集中于重组诺如病毒样颗粒，它含有主要的衣壳抗原，但缺乏病毒复制的遗传物质。VLPs在形态和抗原性上与天然病毒相似，在口服和鼻腔给药后引起体液、黏膜和细胞免疫反应[80-84]。诺如病毒疫苗研发中所面临的挑战是缺乏对于感染后群体免疫的认识，特别是对自然感染后的短期保护性免疫机制的认识不足，以及缺乏可开展有效研究的细胞和合适的动物模型。同时，诺如病毒高遗传和抗原多样性导致很难选择合适的疫苗靶点以达到广泛的保护作用。几种诺如病毒疫苗已经在临床前和临床试验中使用重组诺如VLPs进行了研究，这些重组诺如VLPs具有不同的给药途径，包括鼻内、口服和肌内途径。较早的候选者之一是单价鼻内GⅠ.1重组诺如VLPs疫苗，该疫苗在接种2针次疫苗的健康成人中有70%表现出血清学应答[81]。这种候选疫苗对同源挑战也是有效的，降低了47%的胃肠炎风险和26%的感染风险。它也具有良好的耐受性和免疫原性[81]。该疫苗随后从鼻腔给药途径改为肌内给药途径，从单价制剂改为双价制剂，目前处于Ⅱ期临床试验。改良疫苗含有GⅠ.1和GⅡ.4重组诺如VLPs，是临床发展最快的疫苗[85]。GⅠ.1和GⅡ.4的血清学反应均被证实，并观察到对严重临床症状的保护作用。然而，疫苗对人类诺如病毒感染的保护效力仅为13.6%。另一正在进行临床试验的疫苗是一种以腺病毒载体为基础的诺如病毒疫苗，其片剂配方可编码来自GⅠ.1的全长VP1基因。这种疫苗最近在成人Ⅰ期试验中满足了安全性和免疫原性的主要和次要研究终点要求[85]。

目前，胃肠道病毒感染的预防和控制策略是通过推广标准预防措施及良好的个人卫生习惯(例如，用肥皂和水仔细和彻底洗手)、正确执行环境表面的消毒，通过确定和切断疾病接触者、其他潜在的感染源，消除感染和传播。某些胃肠道病毒(例如，诺如病毒)可能对一些常见的消毒剂和清洗液有抵抗力；次氯酸钠在灭活肠道病毒方面最有效。

五、标本的采集、运送和储存

胃肠炎病毒主要在肠内复制并引起疾病，因此粪便是实验室诊断的首选标本。最好在发病的最初48 h内采集标本，因为这段时间是病毒排毒的高峰期，增加了检出的概率。在48 h后采集的标本的检出率则较低，尽管有报道称一些胃肠炎病毒在发病后的脱落时间有所延长。几克的粪便标本足以进行电子显微镜(electron microscopy，EM)检查及抗原或核酸检测。标本可以从便盆中采集，然后转移到更小的容器或试管中。标本也可以通过木制压舌板从尿片中采集并放置于合适的容器中运送至检验科。然而，粪便收集和运输是繁琐的，如果处理不当可能会导致疾病传播。此外，对于诊所就诊的患者，等待收集粪便标本是不切实际的，而且就诊后回访率很低，导致延误或错过可能对结果产生不利影响的诊断机会。在博茨瓦纳进行的一项的研究中发现[86]，基于人体解剖结构结果设计的无菌植绒直肠拭子(FLOQSwab，Copan Italia，Brescia，意大利)在检测大体积粪便细菌病原体方面表现优异，在使用商品化多重PCR方法检测病毒方面也同样有价值。最近的一项前瞻性研究表明，在呕吐、腹泻或两者兼有的儿童中，上述用于粪便取样的植绒直肠拭子比粪便标本鉴定肠道病原体的检出率高约10%[87]。因此，当紧急鉴定肠道病原体而没有粪便的时候，直肠拭子是合适的诊断替代样本[87]。制定直肠拭子采集和样品运输的标准方案亟待发布。呕吐物标本检测胃肠炎病毒可做粪便标本的

补充[88]，但并不推荐用于常规检测。如果患者不能提供粪便或直肠拭子样本，建议用植绒拭子收集呕吐物，并用与直肠拭子相同的方法储存和运输。一般来说，粪便或直肠拭子样品在采集后应立即4℃保存，然后及时运送到实验室进行处理。如样品不能立即进行处理及测试，则应立即将其置于－70℃保存。若要用于研究，应将一次性使用的多个等量分装样品放置在多个冷藏箱中进行测试和保存。通过这种方式处理，标本不会被反复冻融，从而避免了病毒颗粒、蛋白质和(或)核酸的降解及标本间的交叉污染。粪便标本可采用冰上或干冰运输，具体取决于储存条件(例如，短期或长期储存)。应尽量避免在运输和储存时发生不必要的冻融。

血清标本可用于检测抗胃肠炎病毒IgG抗体。然而，类似检测主要在研究实验室进行，并不适合急性感染的临床诊断。急性期血清标本必须在发病后尽快采集并与恢复期的血清标本同步检测。检测过的血清标本可储存于2～8℃数天直至所有检测结束或储存于至少－20℃以更长期保存。应避免反复冻融，并且不能储存在除霜冰箱中。

饮用水、食物、饮料及其他环境标本需照常采集并用于调查病毒性胃肠炎的暴发情况和追踪感染源，这其中主要见于诺如病毒感染。如果怀疑食物或水是病情暴发的来源，必须在暴发时尽早采集标本并根据何时检测来相应地将标本储存在上文提及的条件下。因为这类标本在大多数诊断实验室不能进行检测，并且常常需要特殊的处理流程(例如，过滤浓缩5～100 L的水，移除食物残渣)，此时应联系有能力处理及检测这类标本的实验室(例如，当地或地区卫生部门，或位于佐治亚州亚特兰大市的疾病预防和控制中心)。

六、直接检测

(一)电子显微镜检查

电子显微镜检查和免疫电子显微镜(immunoelectron microscopy，IEM)已成功运用于快速检测粪便标本中胃肠炎病毒，它能根据完整病毒颗粒特征性的大小和形状，采用负染色技术，在带有支持膜的铜网上直观地对病毒进行同步检测和识别(图95-1)，展现出快速简便的优点。然而，由于仪器的可获得性和成本较高，需要专门设施和专业知识，以及敏感性和特异性较低等诸多缺点，EM和IEM用于检测胃肠炎病毒已逐渐被临床诊断实验室所淘汰。因此，本章不介绍EM和IEM的方法。读者可以在本手册第11版第93章中找到EM和IEM应用的详细信息。

(二)抗原检测法

免疫学检测可用于直接检测经过处理的粪便标本中的胃肠病毒，目前也有一些病毒的商品检测试剂盒。常见的抗原检测方法包括96微孔板酶免疫测定(enzyme immunoassay，EIA)法、乳胶凝集试验和快速膜基免疫层析法。这些检测方法快速、价廉且操作简便，非常适用于大多数(即便不是全部)临床型实验室。通常采用磷酸盐缓冲液(pH＝7.4)或磷酸钠缓冲液(pH＝9.5)制备成10%～20%的粪便悬液。总的来说，可利用的抗原检测方法仍然数量有限，原因是缺乏可用于适合捕获及检测保守病毒抗原的特异性抗体，而一些肠道病毒的检测方法还没有。此外，现有的检测性能仍需要大幅提高，以达到更高的敏感性和特异性。由于肠道病毒的基因和抗原都具有高度多样性，因而许多抗原检测方法的敏感性都相对较低，尽管仍高于EM的敏感性。特定病毒衣壳蛋白的单克隆抗体或超免疫抗体，如轮状病毒的VP6蛋白和诺如病毒的衣壳蛋白或衣壳蛋白P区域，目前都已用来发展这些抗原检测方法。由于缺乏对人类诺如病毒的细胞培养，现已将重组病毒衣壳蛋白在体外系统中的表达用作发展检测试剂的来源。

最近开发的膜基免疫层析法对那些需要诊断散发性病毒性胃肠炎的小型至中型实验室很有价值[89]。这些免疫层析试剂盒可设计成试纸条或卡夹，通常包含内置的阳性对照，以确保反应顺利进行并作适当解读。

检测所需的设备最小，且能够清晰显示检测结果。由于其快速、简单、成本低，使得免疫层析试剂盒可用于床边检测。总之，免疫层析检测法的敏感性及特异性均稍低于常规EIA96微孔板系统。

乳胶凝集试验采用的原理是乳胶微粒吸附病毒的特异性抗体，当病毒微粒或病毒抗原出现在吸附有抗体微粒的样本中时，就会发生凝聚。

由于某些粪便样本也能引起非特异性凝集，因此，试剂盒中也包含了吸附非病毒性抗体的乳胶微粒。制备的粪便悬液含有颗粒物，可能会干扰正常的凝集数据，所以将上清与乳胶试剂混合之前，通常需将粪便低速离心澄清。如果发现数分钟内发生了凝集现象，就说明发生了阳性反应。这种检测的敏感性通常低于EIAs法和免疫层析法，却是小型至中型规模诊断实验室最有用的检测方法[90]。

用于检测轮状病毒和腺病毒的常规96微孔板EIAs法已经在市场上应用多年，目前仍在广泛应用，主要是因为它们具有高度合理的敏感性、特异性及检测结果的一致性。用于检测轮状病毒和腺病毒的免疫层析检测法引进时间较短，但也已经用于诊断，并被人们所接受。用从市场上买到的7种免疫层析法和EIA法对A组粪便样本轮状病毒的检测结果进行比较，6种免疫层析结果与EIA检测结果基本相符，而只有1种阳性检出率明显偏低[91]。

已经开发出了可检测多种病原体的免疫层析检测法，如轮状病毒和腺病毒。直接比较研究表明，这些检测结果与那些常规EIAs检测结果的敏感性和特异性基本相符，因而可用于急诊服务的快速诊断[92-93]。值得注意的是，除了梅利定生物科学公司的40/41型腺病毒克隆EIA之外，从市场上买到的大部分腺病毒抗原检测试样都不具有40和41型肠道腺病毒特异性。

目前，尽管正在开发诺如病毒和星状病毒的多种抗原检测方法使其达到商品化，但大多数检测方法仅具有可用于体外诊断的欧洲CE标识，而无法在美国使用。仅有一种出自拜发公司的诺如病毒检测方法，克伦特罗快速试剂盒，第三代诺如病毒已经获得了美国FDA的认证，可用于在病毒暴发时期对多个样本进行初步鉴定。由于其具有极限敏感性和特异性，因此，现行的诺如病毒检测法主要用于研究，而不建议用于个别散发性疾病的常规临床诊断[94-95]。对检测诺如病毒抗原的商业EIA和免疫层析试剂盒进行的几项研究评估显示，2种方法的敏感性均低于逆转录PCR(RT-PCR)，导致其检测结果明显低于GⅠ和GⅡ病毒[94-95]。

(三)分子检测法

鉴别病毒基因组是病毒性胃肠炎的诊断基础，包括通过电泳直接检测病毒RNA或DNA，采用PCR或PT-PCR及DNA测序技术扩增病毒DNA或RNA。这种分子生物学方法极其灵敏，在快速、准确地检测肠道病毒方面发挥着越来越重要的作用。核酸扩增检测法(如PCR)现已成为胃肠炎病毒的检测方法，越来越多的文献也都证明了这些检测方法的整体效用。

1. 核酸电泳直接染色法 诺如病毒分段、双链RNA基因组已成为传统以来电泳直接检测和基因分型的检测目标[96]。从粪便样本中提取病毒RNA，银染色后通过聚丙烯酰胺凝胶电泳进行分离，最后进行检测。这种技术已经应用多年，主要用于实验室研究，且与EM的敏感性相同。还可应用于对轮状病毒进行分类，不同的电泳现象可能就代表一种新的毒株或新的诺如病毒小组。可将A～G小组诺如病毒的电泳示意图作为参考。采用该技术进行的病毒DNA直接检测和基因分型也可用于诊断已被限制性内切酶处理过的人类肠道腺病毒基因组DNA。

2. PCR与RT-PCR

(1)PCR或RT-PCR核酸提取：采用PCR或RT-PCR对粪便样本进行病毒检测的主要挑战之一就是样本中存在的抑制剂，它可能导致假阴性结果。在进行核酸提取及纯化过程中，可以通过添加内对照样本对这类抑制剂进行监测。减少这类抑制剂的方法包括：稀释粪便和(或)提取核酸；在提取RNA的过程中用螯合剂、洗涤剂或变性的化学物质处理样本[97]；辅助扩展内含物，如PCR过程中的牛血清白蛋白和甜菜碱[98]。目前，大多数核酸提取方法均采用二氧化硅或磁珠提取技术，这种方法简单、高效，且能够提取出适量的高品质核酸，本质上不会被那些可能会抑制或干扰下游扩增的细胞蛋白、糖类和脂类所污染。

从粪便样本中提取的核酸通常包含大量的非病毒核酸，这些核酸主要来自不同的微生物及宿主细胞，而它们可能会被特异性病毒引物进行非特异性扩增。甚至高度严格的反应条件也无法完全剔除这些非特异性PCR产物。在这种情况下，通常需要在PCR过程中与病毒特异性探针进行杂交，以确保检测结果的准确度。已发现粪便样本中存在的非病毒核酸可对二代测序(next generation sequence，NGS)结果的质量产生影响。最近使用NGS检测诺如病毒特征的研究表明，

通过病毒 RNA 富集可以提高 NGS 的效率，包括 Poly(A)尾选择[99]、用诸如病毒特异性引物进行 RT-PCR 扩增[100]、基于 cDNA 扩增片段长度多态性的病毒发现[101]和病毒纯化[102]。去除核糖体 RNA(rRNA)是消除干扰[103-104]的另一种可能的富集方法。

(2)常规 PCR：常规或终点法 PCR(cPCR 或 cRT-PCR)是指常规的扩增过程，其扩增产物可以累积，并在进行检测或分析前随着热循环的完成或终止时到达平台。这类 PCR 产物通常是采用琼脂糖或聚丙烯酰胺凝胶电泳进行长度判别，从而检测扩增的 PCR 产物。通过利用型特异性引物，cPCR 已广泛用于确定病毒性胃肠炎的分子流行病学。例如，通过运用特异性基因区引物，这种基因区可以编码两种主要的病毒表面中和蛋白 VO7(G 型)和 VP4(P 型)，可将 cRT-PCR 用于 A 组诺如病毒的基因分型[105]。除了可对 PCR 产物进行测序，cPCR 也已广泛用于研究轮状病毒的分子流行病学、评估各种诺如病毒菌株的基因变异、调查研究胃肠疾病的暴发情况[6]。cPCR 的主要缺点包括需要多种复合物、劳动强度大且步骤耗时长；产量低、变异率高；污染风险高，原因是扩增产物需要在开放系统下进行操作。尽管 cPCR 仍是许多研究肠道病毒的研究型实验室的常用方法，但还没有在诊断型实验室得到广泛应用。

(3)实时 PCR：目前，单重和多重实时 PCR 已经成为诊断病毒性胃肠炎最常见的方法，为此，已经开发了许多检测方法，并被个体实验室用来检测主要的肠道病毒(表 95-4)。简单地说，通过将非特异性渗入染料或荧光染料偶联到目标特异性探针上，实时 PCR 便可实时检测特异性的核酸序列，且每一个 PCR 循环均可测量扩增产物。该技术的进展包括：预先优化扩增所需的通用试剂和通用条件，简化操作方法及引物和探针的设计，具有多种扩增检测的化学反应及多种可供选择的热循环仪，提高产能且增强其再现性，增加在单个反应中检测多种病毒的灵活性，由于在封闭系统中进行降低了污染风险，提高了相对于常规检测方法的敏感性和特异性和软件化操作。

表 95-4 选定的用于检测可引起胃肠炎的病毒的分子检测法

病毒	引物	探针	靶基因	长度(bp)	仪器	参考文献
轮状病毒	NSP3F/NSP3R	TaqMan	NSP3	87	ABI:7700/7000/7300/7500	112
	RotaAF1.2/RotaA R1.2	MGB TaqMan	VP6	145	ABI:7000	113
	VP2F1-5/VP2R1.2	MGB TaqMan	VP2	79	ABI:7900HT	114
诺如病毒	COG1F/G1R COG2F/G2R Multiplex PCR	TaqMan	ORF1-ORF2 交界区	85-GⅠ 98-GⅡ	ABI:7700/7000/7300/7500	108
	NV192/193-G1 NV107a,c/NV119-GⅡ Multiplex RT-PCR	MGB TaqMan	ORF1-2 交界区	98-GⅠ 94-GⅡ	ABI PRISM:7700	115
	COG1F/G1R-GⅠ COG2F/G2R-GⅡ Mon4F/R-GⅣ	TaqMan	ORF1-2 交界区	85-GⅠ 98-GⅡ 98-GⅣ	Roche: LightCycler1.0	107
	GⅠF/GIR-GⅠ GⅡF and GⅣF/GⅡ&ⅣR	MGB TaqMan	ORF1-2 交界区	85-GⅠ 97-GⅡ &Ⅳ	ABI:7000	116
札幌病毒	sapoFa&Fb/sapoR	MGB TaqMan	聚合酶	104	ABI:7000	116
	SaV124F, SaV1F, SaV5F/SaV1245R	MGB TaqMan	聚合酶衣壳交界	104	ABI:7500 Fast	117

（续 表）

病毒	引物	探针	靶基因	长度(bp)	仪器	参考文献
	CU-SVF1 and CU-SVF2/Cu-SVR	TaqMan 衣壳交界	聚合酶	104	Bio-Rad：iCycler	118
星状病毒	AstU1-4/AstL1-2	TaqMan	衣壳	218	ABI：7000	119
	HastF/HastR	MGB TaqMan	衣壳	67	ABI：7000	116
肠道腺病毒	AdenoF/AdenoR	MGB TaqMan	Hexon	130	ABI：7000	113
	EadVF/R	TaqMan	Hexon	135	ABI：7500	120

用于检测胃肠炎病毒的实时 PCR 检测法是由实验室开发出，这种方法具有优越的性能，比任何一种 EM 和(或)抗原检测法组合都要好。轮状病毒抗原检测虽然不如 PCR 敏感，但在发展中国家中可能为首选，其中低水平轮状病毒可能提示近期感染而不是当前感染。与 PCR 检测相比，抗原价格便宜，需要的专业知识较少。然而，在轮状病毒疫苗广泛接种的时代，这种抗原检测的更高特异性意义已不是很大，而且在大多数情况下，高敏感性的 PCR 是临床实验室检测的首选。

基于 PCR 的方法能够很容易地检测出不同肠道病毒的混合感染，也可以检测出其他方法所能检测出的肠道非病毒病原体。其敏感性和特异性高，检测限为 1.5～3.6 个轮状病毒颗粒[106]，低于诺如病毒的 10 个 RNA 拷贝数[107]。这些方法可根据病毒基因组的高度保守区来选择引物，如轮状病毒的 *VP6*、*VP2* 和 *NP3* 基因。特别是轮状病毒 *NP3* 基因的靶向引物可广泛用于检测，且能够检测最常见的基因型(G1～G4，G9)及某些罕见的基因型，如轮状病毒的 G10 和 G12 型[106]。然而，当双链 RNA 轮状病毒的 PCR 与其他肠道病毒(主要是单链 RNA 病毒，如诺如病毒、札幌病毒和星状病毒)混合分析时，检测相对低丰度的轮状病毒仍然是一个挑战。在逆转录之前在 97℃预热 5 min 是分离双链 RNA 模板的重要步骤，以提高检测能力。

ORF1-ORF2 基因交界区属于诺如病毒最保守的基因区，在基因组内的所有菌株的核苷酸序列具有高度保守性[108]。这一特点使该区域成为设计 RT-定量 PCR(QPCR)分析引物的理想区域，以实现高分析敏感性及对多种诺如病毒基因型的广泛检测，甚至包括最近出现的诺如病毒 GⅡ 17(GⅡ 17 川崎 2014)、GⅡ P16-GⅡ 4 悉尼和 GⅡ P16-GⅡ.2[108-109] 毒株。然而，从保守序列设计的引物和探针未必能保证 RT-qPCR 的敏感性，因为可能发生不可预测的甚至是单核苷酸多态性的突变[110]。因此，应定期监测引物和探针结合位点中的序列变化。个体基因组具有特异性引物(GⅠ和 GⅡ)。现已开发出了具有高敏感性且能够对诺如病毒进行分型的多重实时 PCR[111]。与其他实时 PCR 相比，多重检测将检测时间减少了 50%并降低了试剂成本，从而提高了检测效率。目前也已开发出了含有附加引物和探针的 LightCycler 实时 RT-PCR 方法检测 GⅣ诺如病毒[107]。目前，这种 PCR 以及多重检测法已在全世界的临床型和研究型实验室广泛应用，特别是在北美的实验室。

用于检测札幌病毒、星状病毒和肠道腺病毒的实时 PCR 也已在实验室开发出来，且其高敏感性和特异性也已得到验证，检测率也高于电镜，因而可用于抗原检测[106-107,109,112-120]。

(4)等温扩增法：核酸序列依赖性扩增技术和环介导等温扩增技术(loop-mediated isothermal amplification，LAMP)可用于检测粪便样本中的诺如病毒，属于等温扩增法。这些方法包括单个温度扩增，且无热循环，类似于实时 PCR，其敏感性极高。该技术可用于检测诺如病毒 RNA，但其特异性无法达到临床诊断的要求，原因在于当在相对较低的温度条件下(约 40 ℃)扩增病毒 RNA 时，其强度会随之降低[121]。LAMP 技术的优点是检测速度快，操作简便，反应在单管中进行，且反应时间不超过 1 h。反应通常对生物材料的耐受性较高，所以常常不需要提取大量核酸。而由于扩增仅需要在恒定的低温条件下进行，通常为 60～65 ℃，因此该技术也不需要大型设备，只需要简单的加热器或水浴即可。LAMP 的副产物为焦

磷酸镁。它可以从阳性样本的溶液中沉淀出，引起浑浊现象，也可以轻易地从浊度阅读器中观察出，也可以通过添加金属荧光指示剂来提高产物浊度的可读性。有些实验室的资源有限，进行分子检测的经验不足，且要求快速的周转时间使用整合的床边检测系统，而 LAMP 以其特有的简易性使其在这类实验室中得到了应用。LAMP 技术已经应用于检测 GⅠ和 GⅡ型诺如病毒，且与实时 RT-PCR 的检测结果相当[122-124]。最近，用于检测 GⅠ和 GⅡ型诺如病毒的商业 LAMP 试剂盒已被日本荣研化学株社会(Eiken Chemical Co.)(日本东京)开发了出来，其敏感性高于实验室开发的 LAMP 技术[124]。随着进一步开发和确认，LAMP 技术可能会替代当前用于检测肠道病毒的实时 PCR 检测法。

(5)多重核酸扩增检测组合用于胃肠炎病原体检测：近来，使用纳米技术或实时 qPCR 平台检测肠道病原体的多重和症状特异性分子检测组合已经被开发、验证并用于临床诊断实验室(表 95-5)。微电子学、微流体、微加工的发展已经为新型的和微型的技术开发铺平了道路，其终极目标为提供更加简单、更低成本、床旁可用的分子诊断平台。纳米技术在实验室检测中应用广泛，不受实验室大小、资源或能力，使用最小数量的试剂和样品等的限制，可通过症状特异性多重诊断检测实现对特定疾病的病因学评估。

表 95-5 检测胃肠炎病毒的商品化分子检测方法的更新进展

方法	许可证/审批信息	测试原理	仪器	Vendor	验证/评估数据引用
Luminex xTAG 胃肠道病原体检测组合(GPP)	FDA 批准；IVD[a]	应用多重 RT-PCR 和液体阵列技术检测 15 种病原菌	Luminex 系统	Lumine 公司，得克萨斯州	68
BioFire FilmArray GI 检测组合	FDA 批准；IVD	24 种病原菌的巢式 RT-PCR 和 FilmArray 检测	FilmArray 检测平台	生物梅里埃生物公司	68
Verigene 肠病原体测试(EP)	FDA 批准；IVD	多重 RT-PCR 与阵列杂交	Verigene 检测平台	Lumine，得克萨斯州	https://www.luminexcorp.com/
Allplex 胃肠道全通道测试	CE；IVD	4 种多重 qPCR 板上 25 种病原菌的多重实时 RT-PCR 检测	CFX96 实时 PCR 检测系统(Bio-Rad)	Seegene 公司，首尔，韩国	www.seegene.com/neo/en/products/Gastrointestinal/allplex_GI_fp.php
FTD 病毒性肠胃炎	CE；IVD	5 种胃肠炎病毒的多重 RT-PCR 检测	应用生物系统 7500/7500Fast (Thermo Fisher Science)，CFX96(Bio-Rad)，LightCycler 480(罗氏)和 Rotor-Gene 3000，6000，Q(Qiagen)和 SmartCycler(Cepheid)	Fast Track 诊断公司，斯利马，马耳他	http://www.fast-track-diagnostics.com/human-line/products/ftd-viral-gastroenteritis/

注：[a]IVD. 体外诊断应用

为此，FDA 已经批准了几种商品化的症状特异的多重检测平台，并在最近几年陆续上市，例如，Luminex xTAG 胃肠道病原体检测组合(gastrointestinal pathogen panel，GPP)(Luminex 公司，奥斯丁，得克萨斯州)、FilmArray 胃肠道检测组合(生物梅里埃生物分子诊断公司，盐湖城，犹他州)、Verigene 肠病原体核酸检测(Nanosphere 公司，美国)、Allplex 胃肠道检测组合(Seegene 公司，首尔，韩国)及 FTD 病毒性肠胃炎(Fast Track 诊断公司，斯利马，马耳他)。其中一些平台已经获得了 FDA，加拿大卫生部和欧盟等的许可。最近对实验室开发的多重 PCR 检测方法和 2 种商业化的特异性多重检测平台(xTAG GPP 和 FilmArray 胃肠道检测试剂盒 A)的性能进行的评

估，发现多重PCR检测方法在检测大多数病原体方面比传统方法具有更高的敏感性[125]。xTAG GPP和FilmArray胃肠道检测试剂盒A在检测多种肠道病原体方面显示了相当的检测效能[126]。然而，与实验室开发的基于多重PCR检测的肠道病毒检测组合相比，xTAG GPP检测诺如病毒GII.2的敏感性相对较低[109]。总体而言，这些具有完全自动化和封闭系统的新技术在临床应用中表现出了巨大的潜力，用于识别与散发性胃肠炎和疾病暴发相关的肠道病原体，同时在分析性能（总动手时间仅为2～5 min）和周转报告时间（仅为1 h）方面节省了大量时间。这些改进大大促进了临床医生及时的临床干预和控制疾病的能力。然而，商品化试剂通常不提供在实验室开发的检测试剂中可得到的Ct值（循环阈值），从而限制了其识别低水平阳性（具有高Ct值）的能力，低水平的阳性可能代表已消退感染或污染。此外，商品化试剂（以及实验室开发的试剂）需要定期验证，以确保它们对流行毒株保持最大的敏感性。来自突变、重组或新毒株的病毒序列变化可能会影响检测性能。表95-5总结了当前商品化的自动化检测平台。

(6)下一代测序：下一代测序（next generation sequence，NGS）是一种与经典基因测序完全不同的方法，已经带来了许多突破性的发现，并可能会给基因组科学带来革命性的变化。NGS的原理类似于基于毛细管电泳的Sanger测序：当从DNA模板链重新合成每个片段时，从发出的信号中顺序识别小DNA片段上的每个碱基。NGS以大规模并行的方式将这个过程扩展到数百万个反应中。这一技术的进步使跨越整个基因组的大段DNA的快速测序成为可能，最新的仪器能够在一次测序运行中产生数以百计的千兆级的数据[127]。NGS具有高通量、可扩展性强、分辨率可调、速度超快、动态范围和敏感性不受限制等优良特性。由于诺如病毒具有相对较小的基因组，利用直接测序鉴定可以成为研究诺如病毒的一种新方法。采用最新的NGS扩增子文库制备试剂盒，研究人员可从诺如病毒基因组中快速扩增特定靶区。使用这种方法，可以同时制备跨越多个样品的数千个扩增片段并进行索引。NGS能够实现在单个实验中同时分析感兴趣的所有基因组内容[128]。有了足够的覆盖深度，NGS测序可以识别临床样本中常见和罕见的诺如病毒序列变异[104]。NGS对于跟踪诺如病毒的遗传进化和发现可能导致诺如病毒胃肠炎暴发的新出现的变异具有重要的作用。预计在不久的将来，随着标准试剂和靶向试剂盒的进一步开发，NGS将会用于临床诊断工作流程中来[99-100,103,129-130]。

七、分离程序

细胞培养

虽然可以依据细胞在培养过程中的生长水平来鉴定临床样本中多种不同的病毒，但这种方法通常耗时久，不能迅速地进行疾病管理，如急性胃肠炎。此外，也很难对引起人类胃肠炎的大多数肠道病毒进行细胞培养，原代分离之后需要培养多代才能在细胞培养时正常生长。因此，细胞培养在病毒性胃肠炎的临床诊断中并不常用。轮状病毒分离细胞系包括MdBK、PK-15、BSC-1、llC-MK2、Ma104、CaCo-2和HRT-29。为了保证病毒正常生长，培养基中必须添加蛋白酶，如胰蛋白酶或胰酶，这种方法已被用于蚀斑试验的病毒滴定，以及病毒中和作用的血清分型。

无论诺如病毒引发的散发性和暴发性胃肠炎的临床和公共卫生意义多么重要，但限于诺如病毒不能进行细胞培养，人们对诺如病毒的发病机制的认识仍然受限。40多年来，人们一直努力尝试建立人类诺如病毒的体外培养方法。先前报道的几种试验性细胞培养系统是不可复制的，并且仅支持单个诺如病毒株的少量复制[131-135]。最近，Ettayebi等报道他们成功地实现了多株人诺如病毒在人的小肠类器官中培养，其中三维体外培养来源于人胃肠道活组织检查或手术标本中分离的隐窝中的增殖性干细胞。其中胆汁是诺如病毒在肠道复制所依赖的关键因素[136-137]。这种培养体系重塑了人类肠上皮细胞，并允许对以前不可培养的病毒进行宿主-病原体研究。尽管病毒在该培养体系中的复制和产出经常面临挑战，但诺如病毒细胞培养的这一初步成功为未来诺如病毒致病机理、免疫学、消毒和疫苗开发的研究提供了潜在的突破可能。诺如病毒细胞培养将对研发领域产生最重大的影响，而不是直接用于床诊断。

40和41型肠道腺病毒在格拉哈姆293人类胎肾细胞系中的生长状态最好，而这种细胞系是由5型腺病毒DNA转基因而成。最近，蚀斑试验

已被开发用于检测肠道40和41型腺病毒[138]。

很难对临床样本的星状病毒进行隔离，尽管大多数血清型星状病毒已能够在HEK或LLC-MK2中培养[139]。

八、抗原分型与基因分型

分型系统

抗原与基因分型方法对于理解许多胃肠炎病毒分类和流行病学具有重要作用，而在改进由这些病原体引起的疾病的预防措施方面也同样重要。胃肠炎病毒分型主要应用于研究型实验室，这是因为病毒分型不会影响临床护理与管理决策。

基于轮状病毒2种主要的表面蛋白抗原和基因变异(VP7和VP4)，现已将血清型双抗原和基因分型用于对人类A组轮状病毒的分类。抗原分型通过轮状病毒与单克隆抗体之间的特异性相互作用特征来进行，代表类型为G(VP7)型和P(VP4)型轮状病毒。通过采用仅靶向于VP7和VP4基因区的型特异性引物并运用RT-PCR检测法进行基因分型。如果运用这种分类系统，每一种轮状病毒都可以根据抗原分型法或基因分型法进行G[P]型双重分类。G型抗原分型结果与基因分型结果高度相关，而P型抗原分型结果与基因分型结果的相关性较低。由于型特异性的抗体数量有限，所以通常采用P型基因分型法。轮状病毒的基因和抗原漂移频繁，可能会形成新的变异型，这种类型就无法被当前的分型方法检测到[103]。因此就有必要不断更新方法和试剂，如用于抗原分型的类特异性单克隆抗体和用于基因分型的引物。

轮状病毒的分型也是依据主要结构蛋白VP6和假定的病毒肠毒素nSP4基因的基因变异情况。最近推荐的新型分类系统属于对原有分类系统的扩展，它的分类依据是11种RNA基因组片段的所有序列信息。这种新型系统需要测出11种基因组片段的所有序列，虽然颇具挑战性，但它仍然会影响我们对基因变异、宿主与病原体的相互作用、演变及人类轮状病毒潜在的人畜共患疾病本质的理解。

基因分型为人们进一步了解诺如病毒的遗传进化、分类和分子流行病学提供了必需的信息。有关引起区域性胃肠炎暴发的诺如病毒基因特征的信息可以在国内和国际上进行交流，以绘制导致地方性、流行病或大流行事件的诺如病毒株的趋势。有关诺如病毒的遗传信息对于制定预防诺如病毒感染的策略，如疫苗，也是至关重要的。诺如病毒根据基因分型结果分为基因组、亚基因组、基因型和变异体。随着诺如病毒基因组的高度多样化，基因分型可能需要对后续扩增的RT-PCR产物进行测序。基因组的5个区域(指定为A、B、C、E和D)已成功用于诺如病毒[140-142]的基因分型。近年来，针对诺如病毒衣壳基因(C、E和D区)的引物已被首选用于基因分型，因为病毒衣壳直接参与宿主-受体相互作用和免疫应答，并包含相关的遗传变异。诺如病毒株基因分型的“金标准”是全衣壳测序。然而，对于具有高水平诺如病毒载量的临床样本，扩增部分衣壳序列更实用，并且仅比整体全衣壳测序[143]具有稍低的区分能力。诺如病毒的ORF1和ORF2经常重组。在目前的基因分型方法中单独使用衣壳基因不能鉴定这些重组毒株。据报道，在ORF1/2连接区设计的引物在识别诺如病毒抗原漂移能力上比识别重组事件更有效[144]。

在开发出用于肠道腺病毒检测和分型的EIA单克隆抗体分型方法之前，基因组DNA限制性内切酶分析就已经是常用的分型方法了。此外，用于肠道腺病毒分型的PCR分型或与限制性内切酶联合分析的PCR分型方法也已开发出来[145,146]。最近，实时定量PCR也可用于肠道腺病毒检测，以及40和41型肠道腺病毒的鉴别[147]。采用各种方法进行的现场监测表明，诊断方法的选择可能会影响肠道腺病毒感染的流行病学特点与其疾病负担。可以根据血清学、全基因组测序、系统基因组学分析将68种人类腺病毒(HAdVs)分成7个亚组(A～G)[18-20]。

对星状病毒的分型和免疫检测(如IEM和ELISA分型)已有描述，但还无法达到商品化[59]。最近，Guix等[148]对星状病毒最常用的RT-PCR分型方法进行了总结。

九、血清学试验

抗体中和作用检测原理是采用型特异性单克隆抗体减少蚀斑或阻断抗原表位，这种方法也

适用于轮状病毒。而目前没有适用于其他大多数胃肠炎病毒的血清学中和作用检测方法。然而，将特异性病毒蛋白作为捕获抗原的ELISAs抗体检测法已被用于胃肠炎病毒的流行病学研究。杆状病毒载体和其他系统产生的杯状病毒与星状病毒重组衣壳蛋白已成为进行此类研究优质病毒抗原的来源[149]。以上这些方法在胃肠炎病毒血清监测方面的应用对于理解这些病毒在不同人群中的作用方面发挥了重要作用。对成对的急性和康复期血清进行的血清转化监测可用于暴发调查。

十、结果评价、解释和报告

病毒性胃肠炎的实验室诊断方面仍存在很多问题，而对胃肠炎病毒的检测也十分困难。因此，很多病毒性胃肠病都无法及时确诊。如果肠道病毒真的能在临床型实验室的常规细胞培养系统中生长良好的话，肯定也会缺乏有效的试剂和临床应用方法。商品化快速抗原检测法可用于检测轮状病毒、较小程度上也能检测40和41型腺病毒、诺如病毒、札幌病毒及星状病毒；这种方法能够快速诊断病毒性胃肠病，但却仅具有部分敏感性或特异性，且只能检测特定的病原。近年来，PCR为诊断病毒性胃肠炎提供了巨大希望，且已成为检测病毒性腹泻最敏感、特异性最高的方法。实时PCR已成为胃肠炎病毒检测方面应用最广泛的分子检测方法。

对疑似患有病毒性胃肠病的个人进行实验室诊断的原因有很多。然而，这并不意味着每个患有腹泻疾病的人都必须进行实验室进行检测，因为病毒性疾病是自限性，病程短，而且在大多数情况下不需要具体的临床处理。同时，许多商业化检测的高成本也是限制使用这种检测方法的另一因素。而对病毒性胃肠炎进行早期诊断可更好地管理不同的特定病人群体，如限制不必要的抗生素使用、实验室检测和住院手续，减少住院时间和后遗症，指导治疗措施，提早提供优质护理的知情选择。越来越多的研究也表明，随着那些进行器官移植、患有艾滋病及免疫力差的受试者的粪便病毒脱落周期延长，主要的胃肠炎病毒（如轮状病毒、诺如病毒和肠道腺病毒）也会导致他们患上慢性胃肠炎。临床早期诊断对于调整免疫抑制治疗、进行预后评估及防止疾病传播都有重要意义。当急性胃肠炎暴发时，快速鉴别和监测传染源，如水、食品及环境表面，对于预防和控制社区疾病也同样重要。对处于亚临床感染或慢性病毒脱落状态的食品从业人员进行早期鉴别，也被认为是预防食源性暴发的重要措施。

电子显微镜法也是一种临床诊断病毒性胃肠炎的方法，其特点是简单、快速，尽管其敏感性低于大多数分子诊断法。该方法还需要那些经验丰富的人，因为他们熟悉不同胃肠炎病毒的形态，能够将非典型性病毒颗粒与无关的细胞及微生物结构碎片区分开来，而这些成分在粪便样本中是很常见的。使用包含不同胃肠炎病毒微粒的典型形态特征的参考网格[57]，有助于从事这个领域的新人从中获取经验。免疫电镜可用于识别未知的可能引起急性胃肠炎的病毒病原，但这种方法在诊断型实验室中的应用并不广泛。

虽然抗原检测方法的敏感性适中，但它是一种实用而廉价的方法，可用于初步筛选粪便样本中的特异性病毒。而轮状病毒、肠道腺病毒和星状病毒的商品化检测方法可用于临床诊断（表95-3），此外，基于G型和P型轮状病毒和各种星状病毒的型特异性单克隆抗体的抗原检测方法已广泛用于研究型实验室。人类诺如病毒的商品化检测方法缺乏敏感性和特异性，尽管这种方法可以用于暴发调查，但仍不建议用于临床诊断。

核酸检测法，特别是实时PCR，具有高度的敏感性和特异性，在临床诊断的初步筛选中的应用越来越多。虽然在临床诊断中的用处不大，但具有型特异性引物且能对扩增产物进行测序的cPCR检测法适用于确定病毒性胃肠炎的流行病学特征。

大多数胃肠炎病毒家族基因表现出多样化特征，使得PCR与RT-PCR很难用于临床诊断。而人类诺如病毒的3个基因组中就有40多种公认的基因进化簇。若采用的引物能够靶向于高度保守的基因组区域，就可以检测到大多数已知的人类诺如病毒，但可能没有一种引物对可以检测到全部毒株。在这种情况下，利用能够靶向于不同基因组区域的多元引物集就可以提高检出率。此外，也可以利用已知病毒家族成员序列变异的简并引物。

随着许多病毒、细菌和寄生虫病原体的商品

化的多重检测试剂的应用，病毒性胃肠炎的诊断得到了极大的改善。尽管取得了这些进步，但对于非感染性和毒素介导的腹泻仍无法诊断，只有少数假定的感染性腹泻可实现病原学诊断。更复杂的问题是，由于许多病毒病原体可能导致亚临床感染或长时间后被排泄掉，检测到一种病毒并不能证明它与目前的腹泻事件有因果关系。但在某些情况下，会从同一个临床样本中或临床疾病的同一阶段检测出一个以上病原体，这有利于确定真正的病因。因此，需要注意分析胃肠病毒的实验结果。处理这些问题还需要进行适当的流行病学病例对照研究。

参考文献请扫二维码查阅

第96章 狂犬病病毒*

LILLIAN A. ORCIARI, PAMELA A. YAGER, P. S. SATHESHKUMAR

（侯铁英、李正康 译；崔仑标 审校）

一、病毒分类

狂犬病病毒属中的许多病原体均能导致急性致死性的病毒性脑脊髓炎，在人和动物中最常见的就是狂犬病。这些病原体属于单股负链病毒目和弹状病毒科，是单链子弹状 RNA 病毒。狂犬病毒属共有 14 个种包括原型狂犬病毒（Rabies lyssavirus，RABV）和其他较少见的狂犬病相关病毒：阿拉万病毒（Aravan Virus）、澳大利亚蝙蝠狂犬病毒（Australian bat lyssavirus）、波克罗蝙蝠病毒（Bokeloh bat virus）、杜文黑基病毒（Duvenhage virus）、欧洲蝙蝠狂犬病毒 1 型（European bat lyssavirus type 1，EBLV-1）、欧洲蝙蝠狂犬病毒 2 型（European bat lyssavirus type 2，EBLV-2）、伊科马病毒（Ikoma lyssavirus）、伊尔库特病毒（Irkut virus）、苦盏病毒（Khujand virus）、拉各斯蝙蝠病毒（Lagos bat virus）、莫科拉病毒（Mokola virus）、西高加索蝙蝠病毒（West Caucasian Bat virus）、希莫尼蝙蝠病毒（Shimoni bat virus），以及 2 种新的病毒：莱里达蝙蝠病毒（Lleida bat virus）和甘诺鲁瓦蝙蝠病毒（Gannoruwa bat lyssavirus）（图 96-1）[1-4]。狂犬病毒通过血清中和实验首次被鉴定出来，该方法对于区分病毒的遗传距离也很有用[5]，最近，核苷酸序列分析法被用于差异分析，可将狂犬病毒属分为不同基因型或种类。目前市面上用于人类和动物的狂犬病毒疫苗均以 RABV 为基础进行研制，虽然它可对第一遗传谱系的狂犬病毒属（阿拉万病毒、澳大利亚蝙蝠狂犬病毒、波克罗蝙蝠病毒、杜文黑基病毒、欧洲蝙蝠狂犬病毒 1 型、欧洲蝙蝠狂犬病毒 2 型、伊尔库特病毒、苦盏病毒和甘诺鲁瓦蝙蝠病毒）提供足够的交叉保护，但对于高度分化的第二遗传谱系的狂犬病毒（拉各斯蝙蝠病毒、莫科拉病毒、希莫尼蝙蝠病毒）和第三遗传谱系的狂犬病毒（西高加索蝙蝠病毒、伊科马狂犬病毒和莱里达蝙蝠病毒）的保护效果比较差。

二、病毒描述

病毒颗粒呈弹状，长约 180 nm，宽约 75 nm，由 5 种结构蛋白组成：糖蛋白（glycoprotein，G）、基质蛋白（matrix protein，M）、核蛋白（nucleoprotein，N）、磷酸化蛋白（phosphoprotein，P）、大多聚酶蛋白（large polymerase protein，L）（图 96-2）。病毒在宿主细胞胞质膜上出芽从而将自身包裹在该脂质双层包膜中。膜粒（G 蛋白三聚物）像“钉子”（纤突）一样插入病毒包膜外约 10 nm。狂犬病毒 G 蛋白与宿主细胞表面受体结合（或吸附），可激发一系列的侵染循环和病毒复制，而注射疫苗或者自然感染后产生针对 G 蛋白的病毒中和抗体可能会抑制这个过程。病毒脂蛋白双层包膜的内层主要是 M 蛋白，其与 G 蛋白、包膜和核糖核酸蛋白（ribonucleoprotein，RNP）核心相连接。

核糖核酸蛋白由紧密螺旋的 RNA 和核衣壳（磷酸化的 N 蛋白和关联的 P、L 聚合酶组成）组成。所有的狂犬病毒属都包含一个约 12 kb 的不分节段的基因组（RNA）。RNA-核心蛋白复合物在基因组 RNA 转录为 5 种多聚腺苷酸 mRNAs 的过程中起重要作用，这些mRNAs被翻译成为

*本章包含 Lillian A. Orciari，Cathleen A. Hanlon 和 Richard Franka 在本手册第 94 章中呈现的部分内容

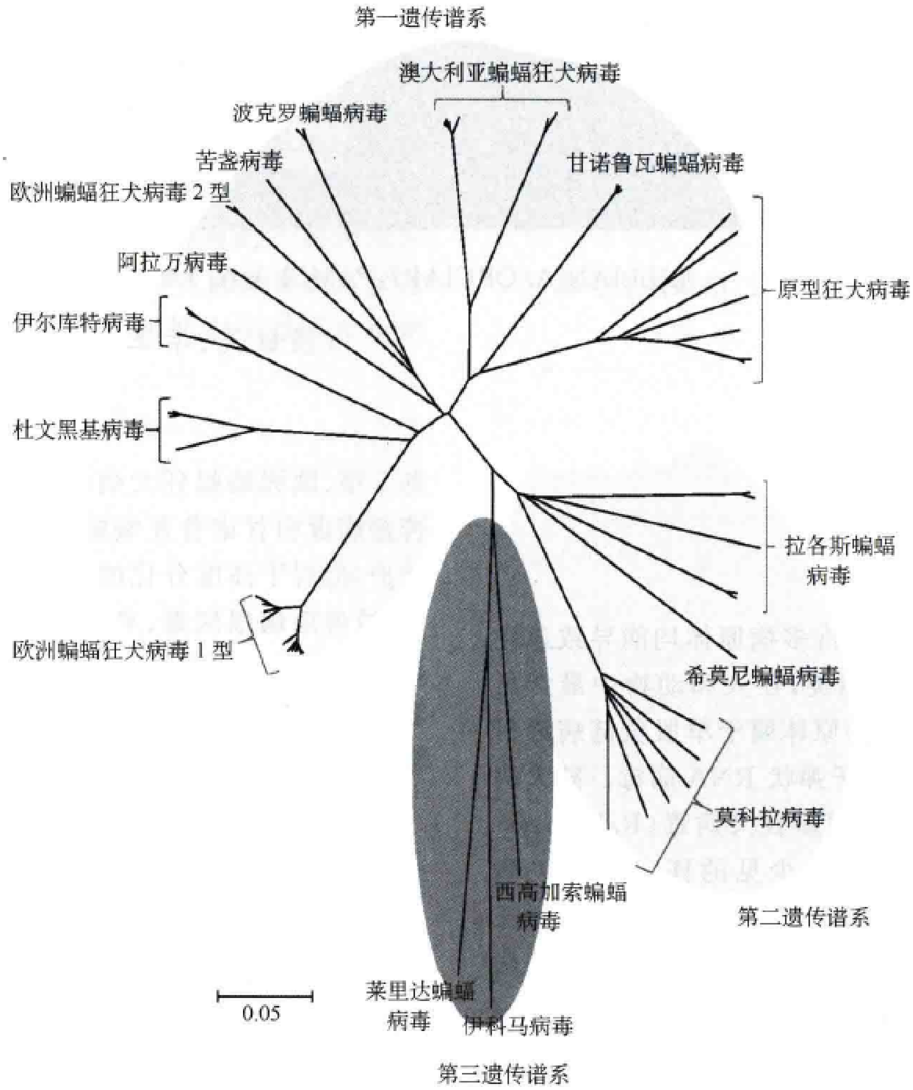


图 96-1 狂犬病毒属生物多样性特点通过基因测序法对限定序列进行分析(主要进行邻接法、最大似然法、最小进化法和 500 次进化树的自展检验)。通过最小进化法构建的一致树展示了与过去发表的研究在拓扑学和遗传关联上的一致性[1-4]。所有 14 种原型狂犬病毒和 2 种拟定狂犬病毒的代表序列均能在 GenBank 找到。第一类遗传谱系(蓝色)是由原型狂犬病毒和紧密相关的狂犬病属组成,目前市面上可供使用的狂犬病毒相关生物制品对该谱系病毒有效。然而,第二(黄色)和第三谱系(粉红色)的高分化狂犬病毒属对这些制品是无效的,见彩插

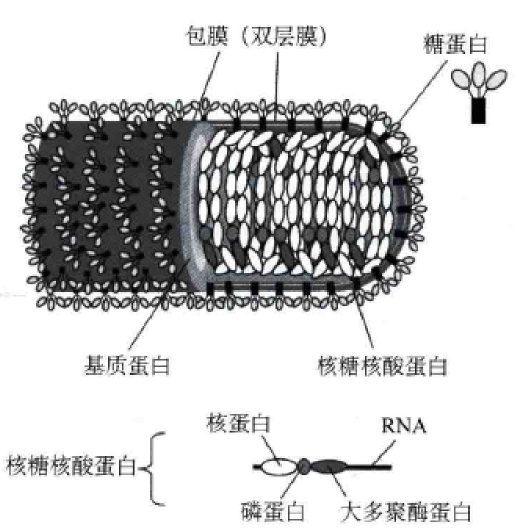


图 96-2 狂犬病毒形态学和结构蛋白图解,见彩插

结构蛋白并为合成子代全长互补正链 RNA 提供模板,从而完成病毒的复制。在病毒组装期间,RNA-M 蛋白相互缠绕后与 G 蛋白连接形成完整的病毒颗粒,然后通过细胞浆膜进行出芽[6-7]。从诊断学的角度出发,N 蛋白、G 蛋白和病毒 RNA 是绝大部分的实验研究评估所关注的焦点。死后脑组织的狂犬病诊断主要是基于对细胞内病毒包涵体(RNP 的集合物)的检测,因为狂犬病毒 G 蛋白与宿主细胞受体相互作用后激发了侵染循环,所以 G 蛋白直接与病毒的致病性、毒性、免疫应答诱导及中和抗体的结合相关。由全病毒制备的疫苗可表达纯化的狂犬病毒 G 蛋白。编码狂犬病毒 G 蛋白的重组疫苗现已成功用于免疫和保护动

物，使其免受狂犬病毒的感染[8-10]。另外，G蛋白的抗体检测已应用于疫苗免疫效果的评价[10]。更详尽的有关狂犬病毒复制和发病机制的研究已有发表[11-13]。而原型狂犬病毒相关的描述(流行病学、传播方式、临床标志物和诊断)对其他狂犬病毒属也适用。

三、流行病学和传播途径

狂犬病是人畜共患病，是主要的一种动物传人的疾病，所有的哺乳动物均对该病毒易感。在区域流行病学方面，尽管原型狂犬病病毒在世界5个大洲中均有流行(总共7个大洲)，但对于其他狂犬病毒属病毒，它们流行区域的分布有一定的局限性，例如，拉各斯蝙蝠病毒、希莫尼蝙蝠病毒、莫科拉病毒、杜文黑基病毒和伊科马病毒仅在非洲被检测到；欧洲蝙蝠狂犬病毒、波克罗蝙蝠病毒和莱里达蝙蝠病毒仅在欧洲被发现；澳大利亚蝙蝠狂犬病毒仅在澳大利亚被发现；阿拉万蝙蝠病毒、苦盏蝙蝠病毒、伊尔库特病毒和西高加索蝙蝠病毒则仅在欧亚地区的单个孤立地区被发现；目前，甘诺鲁瓦蝙蝠病毒(拟定)只在斯里兰卡岛上发现；美国只检测到原型狂犬病毒属。在美国，每年有超过6000例动物被诊断为狂犬病毒感染。而动物作为病毒的重要储存宿主，在不同地区有其相应的代表性动物，例如，在美国东部各州，其主要陆生病毒储存宿主是浣熊；在加利福尼亚地区、中北各州和中南各州的是臭鼬；在北极和亚利桑那州是灰狐；在阿拉斯加州是红狐；在波多黎各是猫鼬。另外，在北美地区，有超过16种独特的狂犬病毒与当地仅有的食虫类蝙蝠的活动范围有关。尽管在大部分的发展中国家，犬类是主要的病毒储存宿主，但在美国和其他发达国家，通过强制给犬类注射疫苗并对流浪动物进行控制，已经阻断了犬类传播狂犬病的传播途径[14-15]。

在发达国家，由于有效地控制了犬类感染狂犬病毒，并且保证了狂犬病预防性药品的有效供给，导致在这些国家很少发生人感染狂犬病毒的案例，在美国每年报道的病例数小于4例。尽管对具有狂犬病毒暴露风险人群的预防相对容易，但在全世界范围内，据估计每年仍有60 000例上述可预防人群的死亡病例发生。分析原因，除了避免与野生动物或未注射疫苗动物、流浪或免疫注射史不明的家养动物等接触外，人狂犬病毒暴露后获得合适的预防性药品从而防止这类可预防疾病导致的人死亡病例的发生也是很关键的，但目前这个问题仍旧是全球迫切需要解决的公共卫生问题。

狂犬病的主要传播途径是通过患狂犬病动物的咬伤传播(大量的病毒藏在唾液中)，人感染狂犬病极少是因为非咬伤暴露而感染的，非咬伤暴露包括抓伤、开放性伤口和受狂犬病毒污染的黏膜[如具有感染性的唾液或者患狂犬病动物的中枢神经系统(CNS)组织]。院内感染(偶然的雾化狂犬病毒吸入性感染)和后续的黏膜接触都是潜在的非咬伤暴露，通过这种途径感染的病例很少，但也有报道[16-17]。污染物暴露(表面污染)感染人狂犬病的病例没有被证实过，最可能的原因是病毒很容易被干燥或者化学品(比如清洁剂等)灭活。所以在发生暴露事件后，要立即用肥皂水和清水清洗伤口，然后进行合理的紧急医疗救助。人狂犬病毒暴露后预防措施的拖延可能会导致死亡。

狂犬病毒对许多通用的实验消毒剂敏感，例如，1:256季铵化合物、0.5%次氯酸钠(10%漂白剂)、碘伏、70%异丙醇和70%乙醇。化学消毒剂对脑组织、脑组织重悬液或者细胞培养皿中的病毒悬液的杀毒效果较差，而对于器械、实验室玻璃器皿、一次性废水的消毒处理最好采用高压蒸汽灭菌法(121℃，15 lb，60 min)[18-20]。

四、临床意义

动物和人的狂犬病起初临床症状不明显也不典型。狂犬病潜伏期主要是在暴露后的几周到几个月之间，接着是前驱症状期，最后发展为急性神经系统疾病。狂犬病的临床特征主要以脑炎的形式显现，不到20%的患者以麻痹的形式呈现。在有典型脑炎症状的患者中，通常会有意识唤醒或者过度兴奋的症状(如谵妄、易激惹或者有攻击行为等)的发生。在间歇清醒期，临床进展主要以吞咽困难、流涎、流泪、出汗、瞳孔扩大和自主神经功能紊乱为特征。脑神经功能紊乱的临床特征可能包括瞳孔大小不等和面部或舌头瘫痪，如出现恐水和恐风提示疾病严重性。在疾病的终末期，多器官系统可能均处于不稳定状态，通常会导致昏

迷和不可逆的死亡发生。狂犬病毒仍旧是所有已知具有感染性的病原体中致死性最高的病原体之一。

以麻痹症状为主的狂犬病，主要临床表现包括肌无力、上升性麻痹或对称性四肢轻瘫。一些病例有喉肌和面肌的松弛或者双耳失聪，类似于急性炎症性多发性神经病（Guillain-Barré 综合征），其他症状包括尿失禁和阴茎持续勃起。恐水症在麻痹型狂犬病中较少发生，但可能发生轻度的呼吸肌痉挛。心肺并发症和功能不稳定通常会导致心搏骤停和人的死亡[21]。

目前，狂犬病在出现明显的临床症状后，还没有明确的治疗方法，一般采用支持治疗，如快速采用镇静和插管的方法进行呼吸道保护，开展联合药物治疗，尝试稳定心肺功能和其他主要脏器功能。2004 年，威斯康辛州的一名高中生感染狂犬病毒后，在紧急医疗救助管理下被成功救助，但目前仍然没有针对狂犬病毒的特效抗病毒药物，大部分患者的预后还是很差。有关狂犬病患者实验室管理的最新消息可以在威斯康辛州医学学会的网站找到：http://mcw.edu/Pediatrics/InfectiousDiseases/PatientCare/rabies.htm.

对于经实验室确认感染狂犬病毒的患者，注射狂犬病疫苗和人狂犬病毒免疫球蛋白（human rabies immune globulin，HRIG）进行救治，其疗效还未被证实，另一方面，这可能会使患者临死前的病毒检测复杂化并可能加快疾病的进展从而导致患者的死亡。

所有潜在的狂犬病病毒的暴露都要根据具体情况进行评估。对于真实暴露（咬伤或者黏膜接触）可疑或者证实感染狂犬病毒动物的患者，应该按照免疫接种咨询委员会（Advisory Committee on Immunization Practices，ACIP）制定的指南[22]快速进行医疗干预和暴露后预防。

未接种疫苗的个体在暴露于狂犬病的动物后，应按照每公斤体重注射 20 个国际单位（20 U/kg）的剂量接种狂犬病毒免疫球蛋白。狂犬病毒免疫球蛋白应该注射在伤口的四周，所有的狂犬病毒免疫球蛋白都应该在疫苗接种部位的远端进行注射，另外，还需要在暴露后按照 0、3、7、14 天的策略接种 4 针经官方授权在美国使用的狂犬疫苗，并根据病情需要，可在暴露 28 天后再接种 1 针疫苗。既往有接受狂犬疫苗免疫的患者，不管目前患者体内狂犬病毒中和抗体的数量有多少，都只需要在 0 和 3 天接种 2 次疫苗[22]。

对于具有感染狂犬病毒风险的人群（实验室工作人员、野外生物学家和兽医），推荐进行暴露前预防。按照免疫接种咨询委员会制定的预防人狂犬病毒指南的要求，对狂犬病感染高危人群需在 0、7、21 或 28 天肌内注射最新的细胞培养狂犬病毒疫苗（经美国政府授权使用）。对于所有高危人群，需每 2 年对狂犬病毒抗体滴度进行检查。而对于某种程度上暴露风险更高的人群，例如，在狂犬病毒研究实验室或者狂犬病毒大批量诊断实验室工作的人群，这类人需要更频繁地对狂犬病毒抗体水平进行检测，如每隔 6 个月检查 1 次，然而暴露前疫苗接种和中和抗体检测并不能对特殊暴露提供足够保护，所以当暴露发生时，伤口的及时清洁和暴露后及时补种疫苗（0、3 天）对于临床结局的改善还是很重要的。

五、标本的采集、运输和储存

标本检测、运输和储存的条件在表 96-1 中进行了汇总。狂犬病毒标本的提交指南和表格可在疾病预防控制中心（Centers for Disease control and Prevention，CDC）网站获得（https://www.cdc.gov/rabies/resources/specimen-submission-guidelines.html.）。动物感染狂犬病毒的诊断需要进行死后脑组织检查，而一个合格的脑组织标本需要包括完整的脑干剖面（脑桥、髓质或者中脑）和小脑（包括蚓部和左右双侧脑叶）。中枢神经系统组织的摘除应该由经过培训的、注射过疫苗的专业人员实施，操作者需要穿戴个人防护装备（至少需要穿戴防护服或者带袖子的实验服，双层乳胶手套或者厚橡皮手套，N95 口罩、面具、护目镜和鞋套）。最后，对动物死后进行狂犬病毒诊断所需的标本收集信息可在疾病预防控制中心的网站找到（http://www.cdc.gov/rabies/pdf/rabiesdfaspv2.pdf.）。

诊断人狂犬病的样本收集信息也可在 CDC 的网站找到（http://www.cdc.gov/rabies/specific_groups/doctors/ante_mortem.html.）。人感染狂犬病毒临死前的诊断需要采集新鲜唾液（无防腐剂或者运输媒介）、直径 5～6 mm 的全厚皮片（颈背部发际线处采集至少包括 10 个毛囊的皮肤标本，将其放置在采用无防腐剂或运输介质的

生理盐水浸湿的纱布上)和血清和脑脊液。唾液标本常用于实时逆转录聚合酶链反应(reverse transcription PCR,RT-PCR),皮肤样本也可用实时 RT-PCR 检测。冷冻切片可通过直接荧光抗体(direct fluorescent antibody, DFA)方法检测狂犬病毒抗原。血清和脑脊液的抗体检测可采用多种方法包括采用快速荧光灶抑制法(rapid fluorescent focus inhibition test,RFFIT)的狂犬病毒抗体中和试验,也可采用狂犬病毒特异性 IgG 和 IgM 抗体与受感染细胞上的狂犬病毒抗原(蛋白)结合的间接荧光抗体检测法(indirect fluorescent antibody test, IFA)。其他样本,如脑组织切片标本,可通过 DFA 法、实时 RT-PCR 法和角膜压片法进行狂犬病毒抗原检测,这对于狂犬病的诊断可能是有用的,但这类标本并不推荐用于常规检测,因为它在采集过程中是有创的而且可能带来潜在的后遗症。为了获得最优的诊断敏感性和特异性,所有这 4 类样本(血清、脑脊液、唾液和皮肤切片)可能必须都要检测(有时可能还要进行连续的重复检测)。患者标本的提交表格可在 CDC 网站获得(https://www.cdc.gov/laboratory/specimen-submission/pdf/form-50-34.pdf. 和 https://www.cdc.gov/rabies/pdf/rorform.pdf.)。标本收集和提交前应先咨询 CDC 狂犬病毒实验室(电话 404-639-1050)。

对于人狂犬病的死后诊断,大脑标本是必须的(标本应包含脑干横切面、小脑、蚓部和左右脑叶),这些标本可用于抗原检测,如果检测阳性,需进一步进行抗原和遗传特征分析。福尔马林固定的组织标本能用于组织病理学分析和抗原检测,但这类标本不推荐作为首选的狂犬病毒诊断标本,首选应该是新鲜脑组织标本。福尔马林固定的标本在用于高度复杂的试验诊断技术前需要经过较长时间的标本处理、石蜡包埋和切片的过程。这可能会延缓诊断,但死后脑组织标本或保留的临死前血清和脑脊液的标本对于狂犬病患者死后诊断可能还是有用的。

把狂犬病毒样本运送到检测实验室需遵循美国交通部对安全运输感染性物质的指示(https://hazmatonline.phmsa.dot.gov/services/publication_documents/Transporting%20Infectious%20Substances%20Safely.pdf)。需进行狂犬病毒诊断的临床标本的包装要求需满足国际空运协会(International Air Transport Association,IATA)关于生物制品运输规则(B 类,UN3373)。细胞培养分离物的包装和携带有更高感染风险的病毒悬液应该满足 IATA 规则[A 类,UN2814(影响人类的感染物质)和 UN2900(影响动物的感染物质)]。狂犬病毒检测标本应用干冰或者同样时效数量的冰袋装运,并以最快捷的运输或快递方法送到诊断实验室。石蜡包埋组织或组织切片应该以室温进行运输,绝对不能冰冻。

实验室诊断的准确性取决于理想的样本收集和储存。新鲜脑组织标本用于狂犬病毒抗原检测、病毒分离和 RT-PCR 最理想的储存条件是 −80℃。进行狂犬病毒抗原检测所需标本的短期储存一般要求是 4℃ 48 h 内、−20℃ 4 周内比较合适。放置在含有 10% 福尔马林缓冲液中的组织标本应在室温下固定 24～28 h。福尔马林固定的脑组织要长期保存,应该在室温下储存在 70%的乙醇中,绝不能冰冻。石蜡包埋的组织和组织切片应该在室温下储存,不能冰冻。

用于 RT-PCR 和病毒分离的唾液标本理想的储存和运输条件是 −80℃甚至更低。皮肤切片标本用于实时 RT-PCR 和抗原检测应储存在 −80℃。用于抗原检测的标本在检测前可短期储存在 −20℃,而用于狂犬病血清学试验的血清和脑脊液标本应该储存在 −20℃甚至更低,标本在测试前可短期储存在 4℃中。全血标本应该离心,只有血清部分才能用于检测。全血标本不能在带有干冰的容器内运输,因为不管隔离包装得再好,都存在冰冻和溶血的风险。溶血和乳糜血清标本不能用于检测。其他的生物液体(例如,玻璃体液、导管冲洗液和眼泪)用于实时 RT-PCR 或病毒分离时需要储存在 −80℃ 甚至更低。

六、直接检测法

直接法能用于检测病理组织改变、病毒抗原(包涵体)和观察病毒颗粒形态。这些方法不需要像细胞培养那样需要进行病毒分离培养或通过 RT-PCR 法扩增基因组,这就使得它们能够在数分钟到数小时内提供快速诊断。

显微镜检查

显微镜检查能通过日常染色(例如,苏木素-

伊红)检查异常的组织病理是否符合脑脊髓炎诊断,或采用更特殊的染色(例如,Sellers、Mann 或吉姆萨染色)观察典型的病毒嗜酸性胞质包涵体,例如,经典的神经细胞内的内氏小体(Negri bodies)[23-24]。历史上,Sellers 染色(亚甲基蓝和碱性品红 2:1混合染液)是最常用于内氏小体的检测,与更先进、更灵敏的抗原检测法相比较,这种染色法在狂犬病后期(该期内涵体是最丰富和最容易检测的)的脑组织(海马、大脑皮质锥体细胞、小脑和浦肯野细胞)病毒检测的应用中是最成功的。其具体的流程如下:脑组织印片用 Sellers 染色剂染 2~10 min(染色时间要根据印片的厚度进行相应的调整),然后用自来水冲洗。可观察到狂犬病病毒感染的典型特征,即在胞质呈现出红色圆形或椭圆形的内有蓝黑色嗜碱性颗粒体的内涵体。尽管过去这种染色方法是很重要的,但该方法在敏感性和特异性方面存在一定的局限性,例如在操作恰当时,也仅能检测出 50%~80%感染狂犬病毒动物体内的内氏小体。而电子显微镜(electron microscopy,EM)能观察病毒颗粒的超微结构、形状和大小,这种技术可用于弹状病毒感染的辅助检查,但需要经验丰富的专业人员进行小心的检查。因此,如果作为日常检测,操作起来会很困难而且花费昂贵[25]。

七、抗原检测

1. 直接荧光抗体检测 中枢神经系统狂犬病毒抗原检测的标准方法是直接荧光抗体检测法(DFA)。这种检测方法具有操作方便、较高的特异性、接近 100% 的敏感性及 3 h 或 4 h 完成的特点。《采用 DFA 法进行狂犬病感染动物死后诊断流程》的材料可 CDC 的网站获得(http://www.cdc.gov/rabies/pdf/rabiesdfaspv2.pdf)。与非特异性的组织染色观察病毒包涵体的方法相比,由于感染的脑细胞内有丰富的狂犬病毒蛋白(抗原)的富集,特别是核糖核酸蛋白,DFA 法通过狂犬病毒多克隆或者单克隆抗体耦联物[由结合全病毒或者核糖核酸蛋白的抗体及异硫氰酸荧光素组成(fluorescein isothiocyanate,FITC)]直接与高度保守的狂犬病毒抗原表位相结合。

印片法是以脑干和小脑(左右部位和蚓部)或海马(左右部位)的横切面作为材料,标本需在 −20℃的温度下丙酮中固定至少 1 h。脑组织印片由 2 种不同的抗狂犬病病毒耦联物进行检测,以保证不同狂犬病毒变异株的抗原检测。该耦联物加入到狂犬病感染的脑组织印片中 37℃孵化 30 min,标记抗体与狂犬病毒蛋白(抗原)相结合形成特异性的抗原抗体-荧光素复合物,然后在 3~5 min 内用磷酸盐缓冲液(phosphafe-buffered saline,PBS)冲洗印片 2 次,特异性的抗原抗体复合物会被保留,这些复合物在装备有 FITC 滤光片的荧光显微镜下呈闪亮的苹果绿色。形态学上,狂犬病毒抗原在镜下可呈现出荧光大小不一、圆或椭圆包涵体、粉尘状颗粒物或线条状(图 96-3)。

2. 直接快速免疫组化检测法 直接快速免疫组化检测法(direct rapid immunohistochemistry test,DRIT)是狂犬病毒抗原检测的备选方法[26]。DRIT 法使用多种生物素标记的抗狂犬病毒核衣壳的单克隆抗体进行病毒抗原检测。到目前为止,这种方法在检测狂犬病毒抗原方面具有和 DFA 法类似的敏感性和特异性。这种方法预期应用的领域包括 DFA 检测结果的确证和公共卫生被动监测系统的强化。与荧光显微镜检测法比较起来,普通光学显微镜就能完成这项检测,在美国,这种方法目前主要用于潜在传播病毒给人类的动物样本的扩大监测方面。然而,在没有荧光显微镜的条件下,DRIT 法作为狂犬病毒抗原检测的备选方法已经被世界卫生组织和世界动物卫生组织接受。这种方法的优点主要有:快速(1 h 内完成)、通过福尔马林固定灭活脑组织切片中的病毒(标准操作程序中采用丙酮固定则不能完全灭活病毒)、所需装备少(只需要一台标准光学显微镜)。DRIT 对于样本的要求是和 DFA,及其他抗原检测法相同的(详细信息参照本章"标本收集、运输和储存"部分的内容)。DRIT 与 DFA 一样均需要脑组织印片,印片首先被固定在 10%的福尔马林缓冲液中 10 min,然后用含 1%吐温 80 的 PBS 液(PBS with 1% Tween 80,TPBS)进行冲洗,在加入主要抗体之前用过氧化氢预处理 10 min。这种检测法是多步骤的过程[涉及的材料主要有:生物素化的一级抗体,链霉素抗生物素蛋白-过氧化酶、3-氨基-9-乙基咔唑(AEC)]:首先是印片用生物素化单克隆抗体孵化 10 min,然后用 TPBS 冲洗,再用链霉菌抗生物素蛋白-过氧化物

酶孵化 10 min，然后用 TPBS 冲洗，最后，用 3-氨基-9-乙基咔唑孵化 10 min 可观察到颜色的改变（红色），接着用蒸馏水冲洗。印片还需要用吉尔苏木素复染 2 min 再用水冲洗，加入带有水溶性封片胶的盖玻片，在标准光学显微镜下进行观察。狂犬病病毒抗原会出现明亮的红色、大小不一、圆形或椭圆形的内容物、粉尘状颗粒物或者线条，与蓝色背景形成鲜明对比（图 96-3）。

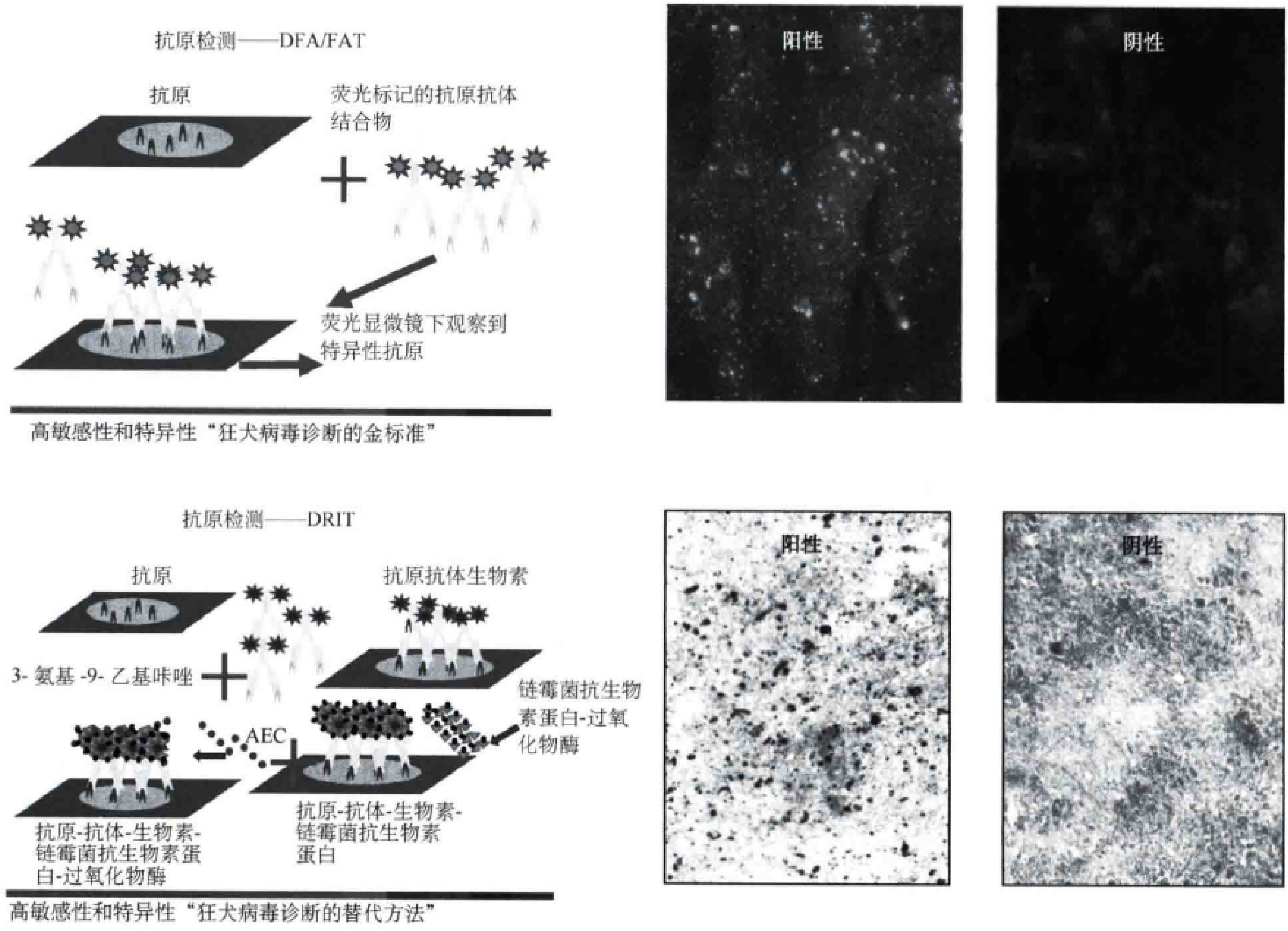


图 96-3　采用 DFA/FAT、DRIT、FAT 和荧光抗体检测法进行抗原检测，见彩插

3. 福尔马林固定组织　福尔马林固定的中枢神经系统组织标本不能用标准 DFA 法检测，因为固定过程会导致蛋白质的化学交联。福尔马林固定的组织标本需要被处理和包埋在石蜡中，对于福尔马林固定的标本，可采用改良的 DFA 法来检测石蜡切片标本，但不管是采用标准 DFA 法、DRIT 法还是改良 DFA 法，福尔马林固定标本的狂犬病毒抗原检测均有同样的取样要求，即需要完整的脑干和小脑的横切片。改良标准 DFA 法在检测福尔马林固定标本中对原法所做的改良主要有：加热切片到 55～60℃以融化石蜡，在二甲苯中去石蜡，在分级乙醇中进行组织切片的复水，另外，还需要蛋白酶 K 在 37℃下消化 30 min。这种方法是假定在福尔马林固定过程中形成分离化学键，从而导致狂犬病毒抗原表位暴露并被检测。另外，改良 DFA 法采用的抗狂犬病毒 FITC 耦联物孵化的时间比标准 DFA 法长（1 h *vs*. 30 min），而且采用 PBS 液（清理组织切片中游离耦联物）进行印片冲洗的时间更长（15 min 内冲洗 2 次）[27]。这种方法的可靠性主要依赖高亲和、高浓度的多克隆抗狂犬病毒耦联物。因此，为了获得较高敏感性和特异性的狂犬病毒抗原检测，采用改良标准 DFA 法对福尔马林固定标本进行检测需要对狂犬病毒耦联物进行 5～10 倍浓度的稀释。

免疫组化法（immunohistochemistry，IHC）是对福尔马林固定组织标本（已经过处理、包埋和切片）进行狂犬病毒抗原检测的备选方法[28]。这种 IHC 也需要将切片加热到 55～60℃以融化石蜡，二甲苯去石蜡，分级醇进行再水化，链酶蛋白酶进

行酶消化（不采用蛋白酶 K）。这种方法与多步 DRIT 法类似首先是 3% 的过氧化氢处理 10 min 以清除内源性过氧化物酶活性，接着加入标准羊血清并孵化 15 min 以阻断非特异性的一抗的结合。单克隆或者多克隆的狂犬病毒一抗加入到切片中并孵化 60 min。以生物素蛋白标记的种属特异性抗体作为二抗加入切片并孵化 15 min。然后用 TPBS 液冲洗，再用过氧化物酶底物、AEC 孵化 5～10 min 后会显示红色。最后用蒸馏水进行冲洗。切片用苏木素进行复染 2 min，用水冲洗，再放上一个带有水溶性封片胶的盖玻片。在标准光学显微镜下观察。镜下可见，苏木素染色后的蓝黑色背景衬托下，狂犬病毒抗原呈亮红色，大小不一，圆或椭圆形包涵体或者感染神经细胞质中尘粒样颗粒。对于福尔马林固定标本，IHC 检测法与改良标准 DFA 法相比较其优点有：可通过纳入多种抗体来同时检测狂犬病毒抗原和其他病原体；能检查组织的病理学改变；用普通光学显微镜而不用荧光显微镜。缺点是操作时间接近 6 h，方法较复杂，需要多种抗体和试剂的最优化配制。

4. 颈部活组织样本的 DFA 检测 临终前标本通过 DFA 法检测狂犬病毒抗原，主要是通过颈部皮肤活检并制作一系列 5 或 6 mm 厚组织冰冻切片来实施的。这种方法可用于毛囊基底部神经细胞病毒抗原的快速检测。组织切片的 DFA 检测应严格按照中枢神经系统组织标准 DFA 检测法实施。在临终前标本检测方面，如果病毒中和抗体存在，这种方法有最佳的敏感性，但在临床早期或者末期仍存有阴性报道，当皮肤切片上的狂犬病毒抗原数量不够，不能在 DFA 下观测到时，可能就要采用实时或者巢式 RT-PCR 法进行确认诊断，但这种情况很少发生。

八、核酸检测

RT-PCR 是狂犬病毒诊断最灵敏的方法。RT-PCR 的敏感性部分取决于标本情况（类型和状态）、样本处理和储存过程中的规范化（避免污染和降解）、RNA 提取和 RT-PCR 的特有方法、扩增引物的选择、试剂质量、个人操作技术熟练程度、结果解释和确认方法。把 RT-PCR 作为死后中枢神经系统组织（新鲜或者福尔马林固定标本）的日常检测手段还是受很多限制的。与其比较，DFA 法进行抗原检测具有高敏感性、高反应活性、费用低和操作时间短等优点，因此，DFA 法对于日常狂犬病毒诊断更有效。但 RT-PCR 作为重要的分子分析方法，在一些情况下，如样本质量较差时，RT-PCR 可对中枢神经系统组织可疑诊断结果进行确证，其实它最大的用途是新鲜中枢神经系统组织无法获得时，在非中枢神经系统样本（临终前唾液、皮肤、角膜印片、眼泪、眼分泌物、咽喉拭子、死后玻璃体）进行核酸检测。当所有的检测条件满足时，RT-PCR 法能检测低至 1 个感染单位的狂犬病毒，而对于少于 1 个感染单位的狂犬病毒标本，采用巢式 RT-PCR 法可使检测的敏感性提高 10～100 倍[29-30]。在检测非 CNS 样本时 RNA 可能会受限或者降解，这时候就需要采用实时 RT-PCR 法。截止到目前，由于病毒属的多样性和特异性非简并引物的缺乏，在狂犬病毒变异或者未知病毒属存在时，实时定量 PCR 法对非 CNS 标本狂犬病毒 RNA 的检测容易失败。最近，一种广谱反应的快速实时 RT-PCR 试剂被用于全系狂犬病毒的检测，这种新型试剂叫 LN34，该试剂采用一种简并引物和探针相结合方法，CDC 按照 CLIS 指南指导下，已证实该方法可用于人临终前狂犬病毒的诊断和死后动物的确诊[31]，据报道该试剂的敏感性和特异性与 DFA 法相当，LN34 的引物和探针是根据狂犬病毒基因组高度保守的非编码前导区和部分核蛋白编码序列区设计的，这种方法对所有已知的狂犬病毒属具有广泛的反应性。

九、狂犬病毒分离

病毒分离在检测具有感染性病毒的标本时是很有用的，有时还被用作 DFA 法的确证实验。经典的方法是采用动物体内分离（乳鼠脑内接种法）和细胞培养体外分离法。最常使用的是细胞培养法，主要选择的细胞包括成神经细胞瘤细胞（MNA；Biowhittaker，Walkersville，MD）或类似的替代细胞系 CCL131（ATCC，Rockville，MD），这种方法的敏感性和动物接种法一致，但出结果更快且没有维护费用（使用实验动物所产生的费用）。为了实现这个目的，用含 10% 胎牛血清的培养液（MEM10）制备成 20% 脑悬液，离心后吸取 0.4 ml 的上清液接种到 4×10^6 MNA 细胞/2 ml

规格的细胞悬液中37℃孵化1 h。为了使细胞感染最大化，每15 min要对细胞悬液进行轻轻地搅拌。细胞悬液要用MEM10稀释到10 ml的体积，6 ml要转接到一个25 ml的细胞培养烧瓶中，剩下的悬液（4 ml）转接到12张涂有聚四氟乙烯的切片或其他细胞培养切片上，至少有一张切片要每天用丙酮固定用于狂犬病毒抗原的检测（DFA法）。至少进行1次细胞传代培养（在3～5天内实施）从而排除狂犬病毒。在理想情况下，体外培养检测应该被保留用于生物制剂或者病毒毒力测试和发病机制等相关的研究。细胞培养在许多方面是很有用的，例如，病毒的增殖、扩大和定量，抗体制备，疫苗生产，疫苗批次的安全性测定，狂犬病毒在特殊细胞的发病机制的研究[32-33]。

十、鉴定

正如前部分内容详细描述的那样，狂犬病毒感染的鉴定主要采用以下几种典型的方法：脑组织印片直接检查、DFA法检测特异性病毒包涵体（抗原）、乳鼠接种病毒分离法和细胞培养法、电子显微镜通过对细胞培养物或者中枢神经系统组织的病毒亚显微结构的观察来鉴定狂犬病毒形态。

狂犬病毒感染的次要特征识别可使用如下几种方法：单克隆抗体进行抗原分型、序列分析进行遗传分型或者交叉中和模式的调查。

十一、分型系统

通过抗原和分子生物学的方法，可以很快鉴定狂犬病毒与食肉动物和蝙蝠变异种的相关关系，通过抗原分析，可识别出至少5种主要的美国食肉动物狂犬病毒宿主。遗传分型可提高分型的分辨率，能识别目前变异株中的7种独特的病毒系。抗原分型在某些情况下较少用于狂犬病毒蝙蝠宿主的分型，核酸序列分析在研究这些样本时可增加分型分辨率，这种分型方法在不同的条件下都很有用，例如，对未知暴露史的人感染病例的狂犬病毒变异株分析、发现新病毒株、监测病毒的流行扩散或者在界定区域内的病毒复发、检测病毒株的宿主转换或者外溢（从主要宿主转到其他宿主）、通过阳性标本的特征分析来监测狂犬病毒疫苗免疫计划的成功与否。

1. 抗原分型 用单克隆抗体（monoclonal antibodies，MAbs）进行抗原分型需要对脑组织印片或病毒感染细胞培养印片进行间接荧光抗体检测（IFA）（丙酮固定标本）或间接快速免疫组化法（IRIT）检测（福尔马林固定标本）[34-35]。如果直接使用脑组织印片，假如75%～100%的显微镜视野下均能发现病毒抗原是最好的结果，如果没有观察到足够的抗原，这时候就需要接种进行细胞培养或者动物接种来扩增病毒量。市面上一款包含7种乳鼠抗狂犬病毒单克隆抗体的制品通过不同的反应模式可用来区分狂犬病毒株。抗原分析法检测狂犬病毒变异株具有价格便宜、操作简单、费时较少（数小时内）的优点。缺点是当抗原数量不够时需要进行扩增，以及对一些陆地生物和蝙蝠病毒的变异株无法进行分辨。如果抗原分型结果不能确定需要在参考实验室（如CDC）再进行一次检测，这次检测就要求有更大范围的单克隆抗体制品和可供序列分析的资源[36]。

2. 核酸序列分析遗传分型法 越来越多地被用于分子流行病学的研究，其中最常使用的是N蛋白基因，很多的研究关注于这段不到400核苷酸长度的短序列，然而，目前的技术已经从部分序列分析扩展到全病毒基因组分析[1-4]。目前，在GenBank上有数千条N蛋白基因序列（完整或局部的）可供比较分析。狂犬病毒的研究人员会通过二代测序方法进行病毒全基因组分析，当需要对小的或者识别困难的基因区进行分析时，可采用Sanger测序法进行研究[4]。这些基因数据有助于了解狂犬病毒属之间的进化关系（图96-1），也有助于了解特异基因在其宿主动物内的功能，还可以预测病毒的发病机制、复制过程和病毒颗粒的形成。

十二、血清学试验

狂犬病毒抗体的血清学试验包括狂犬病毒中和实验和抗体结合试验，每种方法在敏感性、特异性、检测抗体的类型及病毒抗原（蛋白）的识别上都有差异，这些方法（最常用于连续样本的平行实验）被常规用于诊断人感染狂犬病毒[37]。

1. 中和试验 中和试验是预测狂犬病毒免疫应答及对临床末期患者进行狂犬病毒特异性诊断的重要工具。狂犬病毒的中和实验依靠抗体直接与外膜糖蛋白抗原的相互作用,通过不同的血清稀释度检测抗体对抗活性病毒感染的能力(可在细胞培养中或以前常用的人工感染病毒的小鼠中进行)。过去的小鼠中和实验已经很大程度上被快速荧光灶抑制试验(RFFIT)和它的简化法(荧光抗体病毒中和实验,fluorescent antibody virus neutralization test,FAVN)(96 孔微量板)取代了,所有这些方法都是为了测量血清或者脑脊液中的狂犬病毒抗体中和一种已知标准激发病毒剂量的能力。RFFIT 法和 FAVN 法最常用于检测注射疫苗后的免疫状态,前者主要应用对象是人,后者是动物。当在合格的实验室由专业人员操作时,这 2 种方法在检测狂犬病毒中和抗体方面的结果都是可接受的,而且检测的敏感性和特异性类似。同种检测方法每次的检测结果最好根据基于先验的贝叶斯先验选择方法(采用指定的可接受的国际参考标准方法)换成每毫升国际单位来比较[37-40]。

2. IFA 检测 IFA 法是检测体内 IgM 和 IgG 抗体(与感染细胞内的狂犬病毒抗原相结合)的灵敏方法,抗原抗体结合可在人血清或脑脊液中出现,因此是临终前狂犬病毒诊断测试组合的重要组成[27,37]。因此,IFA 法对于针对狂犬病毒内蛋白(如核糖核蛋白,不是 G 蛋白)抗体的检测是很有用的,血清或脑脊液标本要被滴定和加入到含有狂犬病毒(CVS-11 株)的丙酮固定细胞培养液切片中,终末抗体滴度就是显现特异性荧光的最后稀释度。IFA 抗体滴度不相当于狂犬病毒 G 表面蛋白的体内中和抗体滴度。

十三、抗病毒药物敏感性

如前所说,目前还没有特异性的抗狂犬病毒药被批准,因此,狂犬病的预后也非常差,一旦临床特征出现,有超过 99% 的患者会死亡。有关狂犬病毒的实验建议和方法的最新信息可以在威斯康辛医学院的网站获得(http://www.mcw.edu/Pediatrics/InfectiousDiseases/PatientCare/rabies.htm)。

十四、结果的评价、解释和报告

包含了质量保证和控制措施的书面方案对于所有的诊断测试都很重要,所有的试剂使用前应该用来自当地 2 种甚至更多的狂犬病毒变异株已知的阳性样本和已知阴性的对照样本进行优化,在结果解释前应该了解每个诊断测试的准确性和局限性(表 96-1)。美国狂犬病死后脑组织诊断的国家标准方案是 DFA 法。标准 DFA 法、DRIT、RT-PCR 和分离培养法的程序要求可使中枢神经系统组织(狂犬病毒动物的脑干和小脑是最可能阳性的)的检测敏感性最大化,而直接检测和扩增法容易引起交叉污染的问题可通过单独处理尸体标本的方法来避免,例如,使用单独的容器进行丙酮固定和相应的冲洗(DFA 法),使用不同的专用实验区域处理 RNA 和 cDNA 标本来进行 RT-PCR。多名判读者需要对每一次的诊断测试进行评价并提供质量保证。对于狂犬病毒测试是弱反应或者不正常结果(不典型的形态和反应模式,以及与流行病学资料不一致)时要用确证 DFA 法进行确证。对于有非特异反应和不确定结果的标本要送到参比实验室进行确认和其他方法检测。CLIA 验证过的 LN34 实时 RT-PCR 试剂可作为额外确证方法增加不确定 DFA 结果的解释能力。报告结果的时效性直接影响了人的医疗救助和暴露管理,理想情况下,可疑动物(或人类)的中枢神经组织的首次诊断结果应该在 24～48 h 内报告,使潜在的暴露人群和动物能够获得适当的管理,从而达到最佳的预防人和动物感染狂犬病毒的效果。

非常感谢 Michael Niezgoda 提供的显微照片和 Claire E. Hartloge 对稿件的审阅。也非常感谢 CDC 痘病毒和狂犬病毒部其他成员的贡献。

表 96-1 狂犬病毒诊断的常规检测方法

分析方法	检测方法	检测目标	样本	来源	样本要求	检测场所	结果
显微镜检查	特殊染色(如 H&E 和 Seller)	嗜酸性的胞浆包涵体	死后中枢神经系统组织	人类或者动物	脑干、小脑、海马体	病理实验室(医院、兽医)	检测嗜酸性胞浆包涵体,敏感性较低(60%~80%)
免疫荧光抗原检测	DFA	狂犬病毒抗原	死后中枢神经系统组织	人或者动物	脑干和小脑的全剖面	国家公共卫生中心,兽医实验室,CDC	检测狂犬病毒特异性抗原,敏感性达到 100%
免疫荧光抗原检测	DFA(低温恒温器)	狂犬病毒抗原	临死前颈背部皮肤活检	人类	5~6 μm 的全厚皮肤冰冻切片	CDC(部分地区或者国家实验室)	检测狂犬病毒特异性抗原
免疫荧光抗原检测	FF DFA	狂犬病毒抗原	福尔马林固定标本死后神经系统组织	人类或者动物	脑干和小脑的全剖面	CDC(部分地区或者国家实验室)	检测狂犬病毒特异性抗原,敏感性接近 100%
免疫组化法抗原检测	IHC	狂犬病毒抗原	死后中枢神经系统组织	人类或者动物	脑干和小脑的全剖面	CDC(部分地区或者国家实验室)	检测狂犬病毒特异性抗原,敏感性接近 100%
免疫组化法抗原检测	DRIT	狂犬病毒抗原	死后中枢神经系统组织	人类或者动物	脑干和小脑的全剖面	美国 CDC,农业部(部分地区或者国家实验室)	检测狂犬病毒特异性抗原,敏感性接近 100%
核苷酸分析	RT-PCR	狂犬病毒 RNA	死后中枢神经系统组织	人类或者动物	50 mg 的脑干或小脑组织	CDC(部分地区或者国家实验室)	产生特异性的 RT-PCR 扩增,敏感性很高(检测下限大约是 1 U,但与引物的特异性相关
核苷酸分析	巢氏 RT-PCR	狂犬病毒 RNA	死前的唾液、喉咙、皮肤和其他标本	人类	100 μl 的液体标本或者 ≤ 50 mg 的组织标本	CDC(部分地区或者国家实验室)	产生特异性的 RT-PCR 扩增,敏感性很高(检测下限大约是 1 U,但与引物的特异性相关
病毒分离	细胞培养(如 MNA 细胞)及动物接种(如 MI)	具有感染性的狂犬病毒	死后中枢神经系统组织	人类或者动物	20%的脑匀浆	国家公共卫生中心,兽医实验室,CDC	检测感染性的狂犬病毒
血清学(病毒中和抗体实验)	RFFIT, FAVN, MNT	狂犬病毒中和抗体	死前或者死后血清或者脑脊液标本	人类或者动物	血清或者脑脊液	CDC(部分地区或者国家实验室)	检测中和抗体,NT 对免疫状态的测定很有用
间接 IFA 法血清学试验	IFA	狂犬病毒 IgG 或者 IgM 抗体	死前或者死后标本	人类或者动物	血清或者脑脊液	CDC(部分地区或者国家实验室)	检测来自血清或者脑脊液的特异性狂犬病毒 IgM 和 IgG 抗体,作为一种诊断技术具有很高的敏感性

注:H&E. 苏木素-伊红;FF. 福尔马林固定;NT. 中和实验

参考文献请扫二维码查阅

第97章 虫媒病毒

ELIZABETH A. HUNSPERGER

（葛以跃、崔仑标 译；杨滨、汤一苇 审校）

一、分类

虫媒病毒为节肢动物媒介病毒，通过受感染节肢动物的叮咬而传播给脊椎动物宿主，可引起80多种人类疾病。虫媒病毒可根据传播的节肢动物媒介进行分组，这些节肢动物媒介包括蚊子、蜱、白蛉、蠓等（表97-1）。在分类学上大约有532种不同的虫媒病毒，隶属于7个不同的病毒科，分别为披膜病毒科、黄病毒科、布尼亚病毒科、呼肠孤病毒科、弹状病毒科、正黏病毒科和非洲猪瘟病毒科。其中一些家族的病毒只感染节肢动物，没有其他已知的宿主。医学上比较重要的虫媒病毒主要来自披膜病毒科、黄病毒科和布尼亚病毒科，所以本章将重点介绍这3个病毒科。在这3个病毒科中，大约有312种病毒，其中多达70种属于医学上比较重要的病毒。虫媒病毒的发现、分离等相关特征的完整列表可以从虫媒病毒国际目录进行查询（http://wwwn.cdc.gov/arbocat/index.asp）。

表97-1 感染人类的虫媒病毒的特点

科/属	病毒通用名	媒介	疫苗	地理分布[a]	亲嗜性/并发症	其他危险因素
布尼亚病毒科						
内罗病毒属	克里米亚-刚果出血热	蜱	无	A	嗜内脏/出血	潜在的医院感染
正布尼亚病毒属	布旺巴	蚊	无	A	嗜内脏	
	本雅姆韦拉	蚊	无	A	嗜内脏/脑炎	
	瓜鲁	蚊	无	CSA	嗜内脏	
	伊莱沙	蚊	无	A	嗜内脏	
	La Crosse	蚊	无	NA	嗜神经/脑炎	
	塔希纳(Tahyna)	蚊	无	E	嗜内脏	
	Oropouche	蠓	无	CSA	嗜内脏/出血、脑炎	
	塔塔格温	蚊	无	A	嗜内脏	
白蛉病毒属	托斯卡纳	白蛉	无	E	嗜神经/无菌性脑膜炎	
	Hartland	蜱	无	NA	嗜内脏可能	
	Bourbon	蜱	无	NA	嗜内脏可能	
	发热伴血小板减少综合征	蜱	无	SEA	嗜内脏	
	白蛉热(那不勒斯、西西里)	白蛉	无	E, I/SEA	嗜内脏	
	裂谷热	蚊	无	A	嗜内脏/出血、脑炎	
黄病毒科						
黄病毒属	巴休夸拉	蚊	无	CSA	嗜内脏	

（续 表）

科/属	病毒通用名	媒介	疫苗	地理分布[a]	亲嗜性/并发症	其他危险因素
	登革热	蚊	DENVAX	A，NA，CSA，I/SEA，O	嗜内脏/出血、脑炎	输血；经胎盘；镰状细胞性贫血
	日本脑炎	蚊	SJE-VAX/IXIARO	I/SEA	嗜神经/脑炎	
	科萨努尔森林	蜱	无	I/SEA	嗜内脏/出血、脑炎	
	蜱传脑炎	蜱	Ecepur/TBE-Immun	E	嗜神经/脑炎	未经高温消毒的牛奶
	西尼罗/Kunjin	蚊	无	NA，CSA，E，I/SEA，O	嗜神经/脑炎	输血；器官捐赠；经胎盘
	波瓦桑	蜱	无	NA	嗜神经/脑炎	
	墨累谷	蚊	无	O	嗜神经/脑炎	
	黄热病	蚊	YF-VAX	A，CSA	嗜内脏/出血、脑炎	
	罗西奥	蚊	无	CSA	嗜神经/脑炎	
	伊列乌斯	蚊	无	CSA	脑炎	
	鄂木斯克出血热	蜱	无	R	嗜内脏/脑炎	
	圣路易斯脑炎	蚊	无	NA，CSA	嗜神经/脑炎	
	寨卡	蚊	无	A/I/SEA/CSA/NA	嗜内脏	
呼肠孤病毒科						
Coltivirus 属	科罗拉多蜱热	蜱	无	NA	嗜内脏/出血、脑炎	
披膜病毒科						
甲病毒属	巴马森林	蚊	无		嗜内脏	
	基孔肯雅	蚊	无	A，I/SEA/CSA	嗜内脏	
	东方马脑炎	蚊	无	NA，CSA	嗜神经/脑炎	
	西方马脑炎	蚊	无	NA	嗜神经/脑炎	经胎盘
	委内瑞拉马脑脊髓炎	蚊	TC-83	NA，CSA	嗜神经/脑炎	
	奥奈氏	蚊	无	A	嗜内脏	
	马亚罗	蚊	无	CSA	嗜内脏	
	罗斯河	蚊	无	O	嗜内脏	
	西门利克森林	蚊	无	A	嗜神经/脑炎	
	辛德比斯	蚊	无	A	嗜内脏	
弹状病毒科	水疱性口炎	白蛉	无		嗜内脏	
	皮里	蚊	无	CSA	嗜内脏	
正黏病毒科	索戈托	蜱	无	A	嗜神经/脑炎	
	Dhori	蜱	无	I/SEA	嗜内脏/脑炎	

注：[a]A. 非洲和中东；NA. 北美；CSA. 中美洲和(或)南美洲；E. 欧洲和(或)亚洲大陆；I/SEA. 印度和东南亚，包括中国和日本；O. 大洋洲；R. 俄罗斯

二、病原体的描述

虫媒病毒为正链或负链 RNA 病毒(非洲猪瘟病毒科的非洲猪瘟病毒除外),有包膜,基因组为单链 RNA 或节段 RNA,能够在昆虫和哺乳动物细胞中进行复制。正因为大多数虫媒病毒有包膜,所以它们在环境中不稳定,不能在宿主体外存活很长时间。虫媒病毒的颗粒大小介于 40～100 nm,其 RNA 基因组长度为 9000～22 000 bp。许多医学上比较重要的虫媒病毒的全基因序列或部分基因序列已经测定(如结构基因),这些序列可在 GenBank 进行查询,用于诊断试验和疫苗的开发。

虫媒病毒入侵易感细胞后,在细胞质中进行病毒复制。对于大多数虫媒病毒来说,病毒入侵涉及多种受体,但这些受体尚未研究清楚。常见的受体有硫酸肝素蛋白多糖和树突状细胞特异性细胞间黏附分子-3-结合非整合素(DC-SIGN)[1-2]。病毒通过内涵体进入细胞后,被释放到细胞质中,这一过程是由低 pH 环境引起病毒结构蛋白发生不可逆构象改变所介导。对于非分段基因组病毒而言,其 RNA 通过 3′端和 5′端非翻译区的连接形成多联体,进而促进病毒的复制[3]。

黄病毒科有 4 个属:丙型肝炎病毒属、黄病毒属、佩吉病毒属和瘟病毒属,其中只有黄病毒属的病毒是通过节肢动物媒介传播的。这些病毒为单股正链非分段 RNA 病毒,直径为 40～50 nm,基因组大小介于 9000～12 000 bp。病毒基因组包括 3 个结构基因[分别编码包膜蛋白 E、衣壳蛋白 C 和膜蛋白 M(未成熟时称 prM)]和 7 个非结构基因(分别编码 NS1、NS2a、NS2b、NS3、NS4a、NS4b 和 NS5 蛋白),两侧为 5′和 3′非翻译区(图 97-1a)。所有基因均为病毒复制所必需,一些基因如 NS3 和 NS5 高度保守。病毒通过受体介导的内吞作用进入易感细胞后,pH 诱导的结构基因产物构象改变使病毒释放到细胞质中,然后病毒 RNA 被翻译成单一多肽。最终病毒粒子通过分泌途径排出胞外。

披膜病毒科可以分为 2 个属:甲病毒属和风疹病毒属,其中只有甲病毒属的病毒是通过节肢动物媒介传播的。这些病毒为单股正链非分段 RNA 病毒,直径为 60～70 nm,基因组大小介于 10 000～12 000 bp。这些病毒均含有 3 个结构基因(E1、E2 和 C)和 4 个非结构基因(nsp1、nsp2、nsp3 和 nsp4),还具有 5′帽和多聚腺苷酸尾的结构(图 97-1b)。由于这些病毒与动物细胞中的 mRNA 结构相似,所以这些病毒的 RNA 是具有感染性的。类似于黄病毒,这些病毒通过受体介导的入侵感染易感细胞,E1 蛋白的构象变化使病毒从内涵体释放,诱导酸依赖的融合。病毒在胞质中复制,将核衣壳包裹上嵌有 E1、E2 糖蛋白的包膜后,病毒释放。

布尼亚病毒科由五个属组成:布尼亚病毒属、白蛉病毒属、内罗病毒属、汉坦病毒属和番茄斑萎病毒属(该属仅感染植物),其中只有布尼亚病毒属和白蛉病毒属的病毒是通过节肢动物媒介传播的。这些病毒的大小为 90～100 nm,分段基因组大小介于 10 000～22 000 bp。这些病毒为单股负链 RNA 病毒,基因组由 3 个基因片段组成,即大片段(L)、中片段(M)和小片段(S)。L 主要编码 RNA 依赖的 RNA 聚合酶(RdRp),M 编码病毒糖蛋白,这 2 个片段均为负链。而 S 为双义编码链,其负链编码核衣壳蛋白,正链编码非结构蛋白(图 97-1c)。布尼亚病毒属的同一血清型成员之间可能发生基因重组,但同一属的不同血清型之间不会发生基因重组。

一些虫媒病毒因为在特定地域传播已经在种的内部产生了不同的基因组序列,这些病毒被称为基因型、亚型或者谱系(lineages),这是由于病毒在限制性的生态环境中进化所导致,为了提升病毒适应力而趋异进化。3 个科的病毒属的基因型均已有所描述:如黄病毒属(黄病毒科)的日本脑炎病毒(Japanese encephalitis virus,JEV)、登革热病毒(dengue virus,DENV)、黄热病毒(yellow fever virus,YFV)和西尼罗病毒(West Nile virus,WNV);甲病毒属(披膜病毒科)的东方马脑炎病毒(Eastern equine encephalitis virus,EEEV)、西方马脑炎病毒(Western equine encephalitis virus,WEEV)、委内瑞拉马脑脊髓炎病毒(Venezuelan equine encephalitis virus,VEEV);布尼亚病毒属(布尼亚病毒科)的 LaCrosse virus (LACV)等。各病毒科内部的病毒核酸同源性很高。其中最为保守的基因是 RNA 依赖的 RNA 聚合酶所对应的基因和 RNA 复制所必需的非结构基因。病毒科之间相对较高的核酸同源性导致其基因产物具有相同的抗原决定簇,

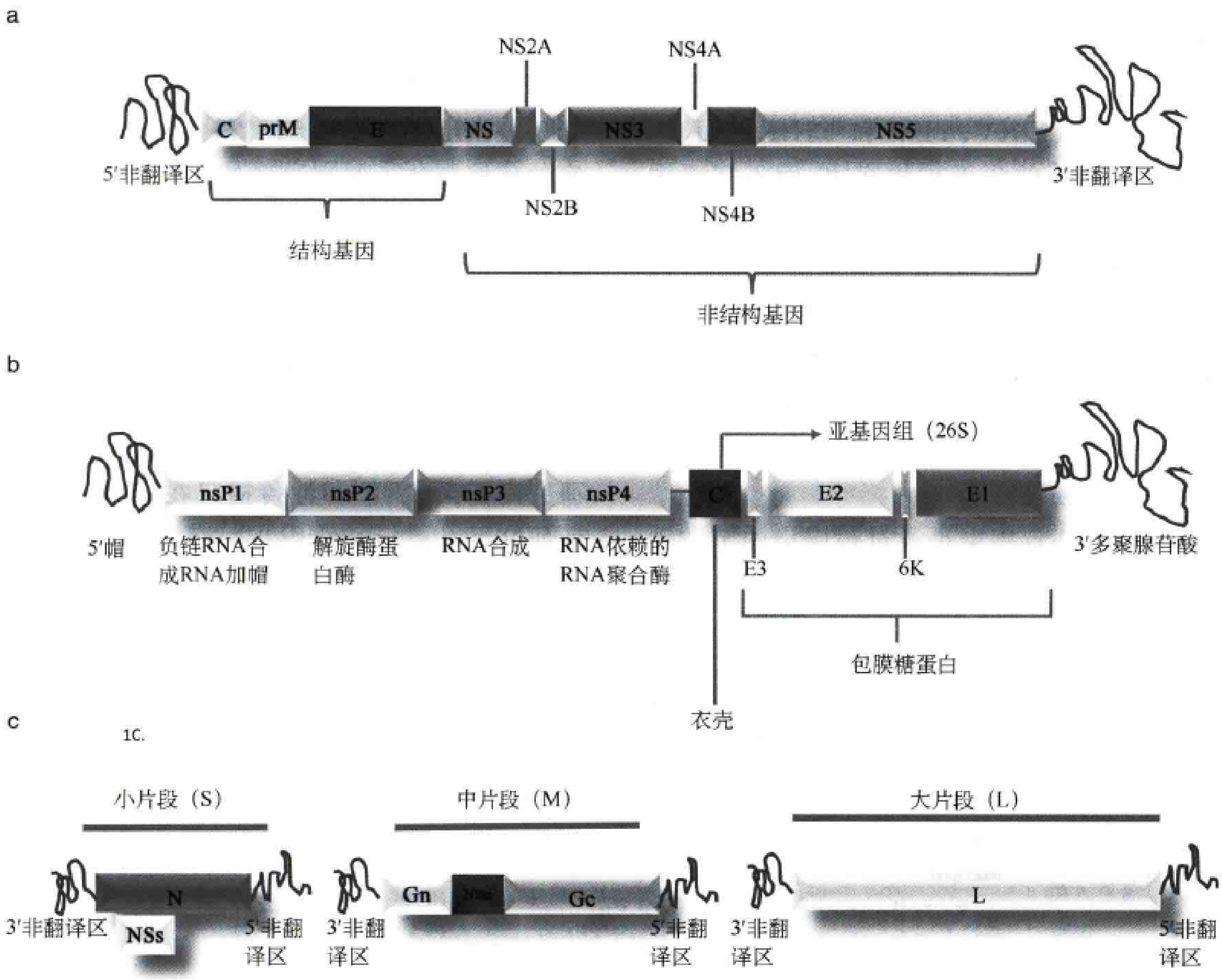


图 97-1 a. 黄病毒属基因组；b. 甲病毒属基因组；c. 布尼亚病毒属基因组，见彩插

这些抗原决定簇是宿主中和抗体的靶标，进而在一些虫媒病毒科间引起显著的交叉反应。然而，这些交叉反应表位往往不具有交叉保护性，且使得免疫诊断试验的结果解释更加困难。

虫媒病毒通过在感染初期阻断干扰素应答来逃避宿主的天然免疫反应。尤其是对于黄病毒而言，其 RdRp NS5 可抑制天然抗病毒应答的关键调节因子Ⅰ型干扰素（α/β 干扰素）[4]。这使得病毒可以在易感宿主体内复制到足以再次感染节肢动物媒介的滴度水平，并继续传播循环。在某些情况下，宿主的免疫反应可通过 Fc 受体促进病毒入侵从而导致病毒滴度进一步增加。这通常被称作抗体依赖性增强效应，尤其见于登革热病毒[5]。

三、流行病学与传播

许多通过蚊子传播的虫媒病毒主要流行于热带和亚热带地区，且高度依赖于媒介和扩增宿主的存在。目前，世界上约 40% 的人口生活在热带地区，均有感染虫媒病毒的风险。传播循环可以是城市（蚊-人-蚊）、森林（蚊-非人灵长类-蚊），也可以是家畜（蚊-脊椎动物-蚊，人类是终宿主）。虫媒病毒的传播具有季节性，在炎热多雨的季节，大多数蚊媒病毒的传播最快，这与媒介的丰度是对应的。虫媒病毒在人群中的流行传播具有周期性，每年都有持续性传播，根据宿主的免疫状态、媒介、病毒和病毒再引入率，每 2～20 年发生一次周期性流行。病毒感染率在年龄或性别方面通常没有显著性差异，然而在高流行地区，正如在登革热病毒所观察到的那样，病毒每年持续传播，年轻人（10 岁以下）的感染率往往高于成年人，因为他们为易感人群[6]。

虫媒病毒的传播循环包括节肢动物媒介和脊椎动物扩增宿主，有些病毒还有终宿主或偶然宿主。一些病毒已进化出城市和森林的传播循环，如基孔肯雅病毒（Chikungunya virus，CHIKV）和

YFV。虫媒病毒能够引起季节性流行往往与传播媒介、中间扩增宿主、易感宿主的数量，以及病毒新基因型、亚型或谱系的引入有关。对于某些虫媒病毒如 DENV、ZIKV、YFV 和 CHIKV 而言，人类已成为其主要的病毒扩增宿主，而不需要中间脊椎动物扩增宿主的存在。虫媒病毒的主要媒介为容器孳生型，它们产卵所需的水量非常少，因此很难控制幼虫和成虫的数量。许多因素可造成虫媒病毒的扩散，包括人口旅行和城市增长失控的人口城市化导致蚊虫孳生地的增加，此外，对这些环境缺乏病媒控制措施也助长了持续性传播和偶发性流行的恶性循环。

大多数虫媒病毒感染是通过被感染的节肢动物叮咬而发生的，然而也有其他感染来源，包括输血、器官捐赠、经胎盘传播、母乳、实验室获得性感染和性传播(表 97-2)。器官捐赠感染在西尼罗病毒于美国出现之后得到了最好的阐释，受感染器官的移植导致了器官受者的死亡[7]。这些研究促进了其他通过血液和器官捐赠导致虫媒病毒感染的相关研究，特别是可以导致高比例(75%)无症状感染的 DENV、ZIKV 和 CHIKV，其病毒滴度足以引起输血感染或器官接受者的感染[8]。其他一些研究证实了母乳中存在 CHIKV、WNV、ZIKV 和 DENV，但是通过这种途径垂直传播的研究尚不太多[9-12]。性传播只在 ZIKV 感染中有所研究[13]。

表 97-2 可用于虫媒病毒诊断的商品化试剂盒

种	病毒	试剂名称	生产商	原产国	试验类型
黄病毒属	登革热	Simplexa Dengue Kit	Focus Diagnostics	美国	分子
		LightMix Kit Dengue Virus	Roche/TIB MOBIOL	德国	分子
		Sentosa SA Dengue I-IV RT-PCR Test	Vela Diagnostics	新加坡	分子
		Dengue Virus II Real Time RT-PCR Kit (CE Marked)	Vacunek	西班牙	分子
		Geno-Sen's Dengue 1-4 Real Time PCR Kit	Genome Diagnostics Pvt, Ltd.	荷兰	分子
		Dengue Virus (Multiplex)	Mikrogen Diagnostik	德国	分子
		Dengue Virus	Genesig	英国	分子
		abTES DEN 5 qPCR I Kits	AIT biotech	新加坡	分子
		DiaPlexQ Dengue Virus Detection Kit	SolGent	韩国	分子
		Dengue RNA Real Time PCR Kit	Co-Diagnostics	美国	分子
		RealStar Dengue RT-PCR Kit	Altona Diagnostics	德国	分子
		Dengue Virus Real Time RT-PCR Kit	Centena Biomed	印度	分子
		Dengue Virus	TIB MolBiol	德国	分子
		PLATELIA Dengue NS1 Ag	BioRad	法国	抗原
		Dengue NS1 Ag ELISA	Standard Diagnostics, Inc.	韩国	抗原
		Dengue Early ELISA	Panbio	澳大利亚	抗原
		DENV Detect IgM MAC ELISA[a]	InBios International, Inc.	美国	免疫诊断
		Dengue Virus IgM Human ELISA Kit	Abcam	中国	免疫诊断
		Dengue Duo IgM IgG Capture ELISA	Iverness	澳大利亚	免疫诊断
		AlphaWell Dengue IgM	Mikrogen Diagnostik	德国	免疫诊断
		AlphaWell Dengue IgG	Mikrogen Diagnostik	德国	免疫诊断
		NovaLisa Dengue Virus IgM μ-Capture	NovaTec Immunodiagnostics GmbH	德国	免疫诊断
		NovaLisa Dengue IgG	NovaTec Immunodiagnostics GmbH	德国	免疫诊断
		NovaLisa Dengue IgM	NovaTec Immunodiagnostics GmbH	德国	免疫诊断
		DENV JE MACE	Venture Technologies Sdn Bhd	马来西亚	免疫诊断
		Focus DENV IgM Capture/IgG DxSelect	Focus Diagnostics	美国	免疫诊断

（续　表）

种	病毒	试剂名称	生产商	原产国	试验类型
		PATHOZYME-DENGUE IgM/IgG and IgM	Omega	英国	免疫诊断
		ImmunoComb Dengue IgM & IgG BiSpot	Orgenics	以色列	免疫诊断
		Dengue Virus IgM ELISA	Genway Biotech, Inc.	美国	免疫诊断
		Dengue Virus IgG ELISA	Genway Biotech, Inc.	美国	免疫诊断
		ImmunoLISA Dengue IgM/IgG Capture	Orgenics	以色列	免疫诊断
		ELISA IgM and IgG Formats	Panbio	澳大利亚	免疫诊断
		EUROIMMUN DENV Mikrotiter ELISA	Euroimmun	德国	免疫诊断
		Dengue IgM capture ELISA	Standard Diagnostics, Inc.	韩国	免疫诊断
		Dengue virus IgM ELISA	IBL International	德国	免疫诊断
		Dengue virus IgG ELISA	IBL International	德国	免疫诊断
		Dengue virus ELISA kit (HRP)	Novus Biologicals	美国	免疫诊断
		EUROIMMUN DEN 1-4 IIFT Biochip	Euroimmun	德国	免疫荧光
		Dengue Virus Type 2 Antibody Detection	Progen Biotechnik	德国	免疫荧光
	西尼罗	Geno-Sen's West Nile Virus Real Time PCR kit	Genome Diagnostics Pvt, Ltd.	荷兰	分子
		RealStar WNV RT-PCR kit	Altona diagnostics	德国	分子
		Artus WNV LC RT-PCR Kit and TM kit	Qiagen GmbH	德国	分子
		West Nile Virus	TIB MolBiol	德国	分子
		West Nile Virus Real Time RT-PCR kit	Centena Biomed	印度	分子
		West Nile Virus (multiplex)	Mikrogen Diagnostik	德国	分子
		West Nile virus IgM Capture ELISA[a] (8/2004)	Panbio	澳大利亚	免疫诊断
		West Nile Detect IgM Capture ELISA[a] (11/2004)	InBios International, Inc.	美国	免疫诊断
		West Nile Virus DxSelect ELISA[a] (6/2004)	Focus Diagnostics	美国	免疫诊断
		EUROIMMUN WNV ELISA (IgM)[a] (8/2016)	Euroimmun	德国	免疫诊断
		Panbio WNV IFA Slides	Panbio	澳大利亚	免疫荧光
	圣・路易斯脑炎	Arbovirus IFA IgM and IgG	Focus Diagnostics	美国	免疫荧光
	黄热病	FTD Tropical Fever Africa (YFV multiplex)	Mikrogen Diagnostik	德国	分子
		IFA IgM and IgG	Euroimmun Biochip technology	德国	免疫荧光
	日本脑炎	Japanese Encephalitis Virus Real Time RT-PCR kit	Vacunek	西班牙	分子
		Japanese Encephalitis Virus Real Time RT-PCR kit	Centena Biomed	印度	分子
		Geno-Sen's JEV Real Time PCR kit	Genome Diagnostics Pvt, Ltd.	荷兰	分子
		FTD Tropical Fever Asia (JEV multiplex)	Mikrogen Diagnostik	德国	分子
		JE Detect IgM MAC ELISA	InBios International, Inc.	美国	免疫诊断
		Panbio Japanese Encephalitis-Dengue IgM	Panbio	澳大利亚	免疫诊断
		EUROIMMUN JEV IgG/IgM IIFT	Euroimmun	德国	免疫诊断
	蜱传脑炎	SERION ELISA Classic TBE Virus IgG/IgM	Virion/Serion	德国	免疫诊断
		IMMUNOZYM FSME IgG All species	Progen Biotechnik	德国	免疫诊断
		IMMUNOZYM FSME (TBE) IgM	Progen Biotechnik	德国	免疫诊断
		EUROIMMUN TBEV Mikrotiter ELISA	Euroimmun	德国	免疫诊断
		EIA TBE Virus IgM/ EIA TBEV IgG+avidity	TestLine Clinical Diagnostics	捷克共和国	免疫诊断
		TBEV/FSME IgM ELISA	IBL International	德国	免疫诊断

（续 表）

种	病毒	试剂名称	生产商	原产国	试验类型
		TBEV/FSME IgG ELISA	IBL International	德国	免疫诊断
		Virotech FSME IgG/IgM ELISA	Sekisui Virotech GmbH	德国	免疫诊断
		NovaLisa TBEV IgG	NovaTec Immunodiagnostics GmbH	德国	免疫诊断
		NovaLisa TBEV IgM	NovaTec Immunodiagnostics GmbH	德国	免疫诊断
		IBL TBE IgG ELISA and IgM ELISA	IBL International	德国	免疫诊断
	寨卡	Anti Zika Virus ELISA/IIFT (IgM or IgG)	Euroimmun	德国	免疫诊断
		ZV IgM ELISA	MyBiosource	加拿大	免疫诊断
		anti-Zika virus IgM ELISA kit (μ-capture)	Abcam	中国	免疫诊断
		Zika Virus Detect IgM Capture ELISA[b] (8/2016)	InBios International, Inc.	美国	免疫诊断
		anti-Zika virus IgM ELISA kit (μ-capture)	NovaTec	德国	免疫诊断
		ADVIA Centaur Zika test[b] (9/2017)	Siemen Healthcare Diagnostics, Inc.	美国	免疫诊断
		LIAISON XL Zika Capture IgM assay[b] (4/2017)	DiaSorin Inc.	美国	免疫诊断
		Zika ELITe MGB kit[b] (12/2016)	ELITechGroup, Inc.	美国	分子
		RealStar Zika Virus RT-PCR kit[b] (5/2016)	Altona Diagnostics	德国	分子
		Sentosa SA ZIKV RT-PCR test[b] (9/2016)	Vela Diagnostics	新加坡	分子
		LightMix Zika rRT-PCR test	Roche	德国	分子
		Zika Virus RNA Qualitative rRT-PCR[b] (4/2016)	Quest Diagnostics	美国	分子
		RealStar Zika RT-PCR[b] (5/2016)	Altona Diagnostics	德国	分子
		Aptima Zika assay[b] (6/2016)	Hologic, Inc.	美国	分子
		Zika Virus Real-time RT-PCR[b] (7/2016)	Viracor Eurofins	美国	分子
		VERSANT Zika RNA 1.0 assay[b] (7/2016)	Siemen Healthcare Diagnostics, Inc.	德国	分子
		xMAP NultiFLEX Zika RNA assay[b] (8-2016)	Luminex Corp	美国	分子
		Sentosa SA ZIKV RT-PCR test[b] (9/2016)	Vela Diagnostics	美国	分子
		Abbott RealTime ZIKA[b] (11/2016)	Abbott Molecular Inc.	美国	分子
		Gene-RADAR Zika Virus test[b] (3/2017)	Nanobiosym Diagnostics, Inc.	美国	分子
		TaqPath Zika Virus kit[b] (8/2017)	Thermo Fisher Scientific	美国	分子
甲病毒属	基孔肯雅	RealStar Chikungunya RT-PCR kit	Altona Diagnostics	德国	分子
		Chik Virus	TIB MolBiol	德国	分子
		abTES CHIKU qPCR I Kits	AIT biotech	新加坡	分子
		Sentosa CHIKV RT-PCR Test	Vela Diagnostics	新加坡	分子
		Chikungunya Virus Real Time RT-PCR Kit	Centena Biomed	印度	分子
		Geno-Sen's Chikungunya Virus Real Time PCR Kit	Genome Diagnostics Pvt, Ltd.	荷兰	分子
		Chikungunya Virus (Multiplex)	Mikrogen Diagnostik	德国	分子
		Chikungunya IgG/IgM Human ELISA Kit	NovaTec Immundiagnostica GmbH	德国	免疫诊断
		Chikungunya IgM ELISA	Standard Diagnostics, Inc.	韩国	免疫诊断
		Chikungunya Virus IgM Human ELISA Kit	Abcam	中国	免疫诊断
		Chikungunya IgM ELISA Test Kit	Genomix Biotech	印度	免疫诊断
		Chikungunya Virus IgG Capture ELISA	Genway Biotech, Inc.	美国	免疫诊断

（续 表）

种	病毒	试剂名称	生产商	原产国	试验类型
		Chikungunya IgM μ-Capture ELISA	IBL International	德国	免疫诊断
		Chikungunya IgG Capture ELISA	IBL International	德国	免疫诊断
		Chikungunya Virus IgM μ-Capture ELISA	Genway Biotech, Inc.	美国	免疫诊断
		EUROIMMUN CHIKV IgG/IgM IIFT	Euroimmun	德国	免疫荧光
	罗斯河	Ross River TAB ELISA	IBL International	德国	免疫诊断
		Panbio Ross River Virus IgG/IgM	Panbio	澳大利亚	免疫诊断
		Arbovirus IFA IgM and IgG	Focus Diagnostics	美国	免疫荧光
	东方马脑炎	Arbovirus IFA IgM and IgG	Focus Diagnostics	美国	免疫荧光
	西方马脑炎	Arbovirus IFA IgM and IgG	Focus Diagnostics	美国	免疫荧光
布尼亚病毒属	La Crosse	Arbovirus IFA IgM and IgG	Focus Diagnostics	美国	免疫荧光
白蛉病毒属	托斯卡纳	TOSCANA VIRUS IgG/IgM	Diesse	意大利	免疫诊断
		Toscana Virus (TOSV) Real Time RT-PCR kit	Vacunek	西班牙	分子
		EUROIMMUN Sandfly Viruses IIFT BIOCHIP	Euroimmun	德国	免疫荧光
	那不勒斯	EUROIMMUN Sandfly viruses IIFT BIOCHIP	Euroimmun	德国	免疫荧光
	裂谷热	Rift Valley Fever Virus PCR kit	Centena Biomed	印度	分子
		RVF Diagnostics Kits IgG, IgM, Antigen	BDLS Diagnostic Test Kits	英国	免疫诊断
	克里米亚-刚果出血热	CCHF IgM, Human	BDLS Diagnostic Test Kits	英国	免疫诊断

注：[a] FDA 批准(月/年)。[b] FDA 紧急使用授权(月/年)

历史上，虫媒病毒的分布具有地域性，只能在世界的某些洲或者特定地区进行有限的传播[如蜱传脑炎病毒(tick-borne encephalitis virus，TBEV)分布于欧洲和亚洲部分地区]。然而，近年来的全球化和虫媒病毒媒介的传播把这些病毒引入了世界上它们从未传播过的地区(如美国的WNV、ZIKV和CHIKV)。当环境因素有利于媒介、病毒或二者兼之的时候也有助于虫媒病毒的传播。随着人、动物和媒介的旅行或移动变得更加容易，新型虫媒病毒的引入或虫媒病毒在新的地区或大陆的出现已经变得相当普遍。同时，媒介的生态学或特定人群中易感个体数量的变化在虫媒病毒的传播中亦发挥着重要的作用，特别是在人类为主要扩增宿主的地方。当今世界的全球化是将媒介引入新地区的主要原因，随着受感染的人、动物或者媒介旅行或移动的增加，由于易感宿主的存在，为病原体的适应和生长提供了特定的环境[14]。例如，WNV通常在东非和中东流行，1999年在北美发现并获得分离。遗传分析表明，美国的WNV疫情是病毒由中东传入北美地区所导致的。传入途径究竟是通过蚊虫还是宿主尚未完全阐明。然而，WNV在1999年于纽约出现之后以惊人的速度席卷美国，主要是因为新大陆的禽类宿主比旧大陆禽类宿主更为易感。所以，WNV在美国北部的流行传播导致禽类死亡的数量惊人，特别是鸦类，尤其是美国乌鸦(北美洲的短嘴鸦)[15]。虫媒病毒在地域上迅速扩张的另一个例子是主要通过埃及伊蚊媒介传播的CHIKV。CHIKV膜融合糖蛋白的一个单位点突变增加了其对白纹伊蚊的适应性，导致了印度洋热带地区疫情的暴发[16-17]。后来在2014年，CHIKV传播至加勒比海的圣马丁小岛，从而在美洲出现。在到达加勒比海地区的一年内，病毒传播至26个加勒比岛屿和14个国家，报告病例数超过100万[泛美卫生组织(PAHO)报告]。虽然CHIKV存在森林循环，但它的主要传播途径是人到蚊再到人，因此其传播至美洲的途径应该是感染者从亚洲特定地区旅行到美洲所致。序列分析确定了流行的病毒正是亚洲基因型[18]。继基孔肯雅热暴发后，又发生了虫媒病毒跨地域传播的历史事件。2014年3月，智利复活节岛首次报告了美洲本地传播的ZIKV病毒，随后在2015年3月，该病毒

在巴西出现[19]。之前，一般认为 ZIKV 主要在亚洲和东非地区流行，只引起轻微疾病，而且没有出现过暴发[20]。到 21 世纪初，该病毒传播至南太平洋地区，于 2007 年在密克罗尼西亚联邦雅普岛出现了第一次大规模暴发[21]。继 2015 年在巴西出现之后，ZIKV 迅速传播至整个美洲和加勒比岛屿，并于 1 年之内扩散至 11 个国家(PAHO 网址：http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=11959:timeline-of-emergence-of-zika-virus-in-the-americas&Itemid=41711&lang=en)。之前的研究指出，ZIKV 引起一种自限性轻微疾病，包括发热、皮疹、肌痛和结膜炎，所以它传播至美洲不会导致人群的高发病率或死亡率。然而，巴西报告的 ZIKV 感染女性其宫内感染的新生儿出现先天性小头畸形，使得 ZIKV 感染已成为突发公共卫生事件，并引起了全球公共卫生机构[如世界卫生组织(World Health Organization，WHO)]的关注[22]。

虽然虫媒病毒在世界上新的地域的传播和引入值得警惕，但已知病毒的再发和新病毒的发现同样重要。例如，1958 年在加拿大安大略省的波瓦桑发现了一种蜱传病毒波瓦桑病毒，随后美国报道了越来越多的由该病毒引起的新病例。有利于媒介丰度的气候变化被认为是出现这些新病例的主要原因。YF 是一种可用疫苗预防的疾病，2016 年在非洲和南美洲再发，引发了大规模疫情，导致来自 6 个不同国家共计 7509 例疑似病例和 171 人死亡[23]。这可能是由于疫苗供应短缺，以及在媒介和病毒流行和传播的国家，特别是可以维持森林循环的地区缺乏常规疫苗接种所导致的。最近还发现了一些其他新型病毒，包括 Heartland virus(白蛉病毒属)、发热伴血小板减少综合征病毒(白蛉病毒属)和 Bourbon virus(托高土病毒属)，所有这些病毒都通过蜱进行传播[24-26]。这些病毒已经导致了严重人类疾病和死亡，关于它们的自然宿主和传播循环还有许多需要研究的地方。世界范围内医学重要虫媒病毒的当前最新流行信息可以在疾病预防和控制中心(Centers for Disease Control and Prevention，CDC)和世界卫生组织(WHO)网站上查到(https://www.cdc.gov/ncezid/dvbd/about.html 和 www.who.int，按疾病列出)。

四、临床意义

虫媒病毒的自然感染发生于受感染的节肢动物吸血叮咬易感者之后，然而其他感染途径也是存在的。许多疾病是由医学上重要的虫媒病毒引起的，它们均为人类致病原，这些疾病的临床表现多样，从轻微的流感样症状，如发热、乏力、皮疹和头痛，到出血、脑炎等严重疾病，偶尔可导致病例死亡。这些临床症状可以根据病毒主要是嗜内脏型还是嗜神经型进行分类。嗜内脏的病毒引起发热性疾病，常表现为皮疹和关节痛，其他报道的临床症状还有肌痛、黄疸、呼吸道症状、畏光等。对于常见虫媒病毒的嗜性及相关的由重症疾病所致的并发症总结并归纳于表 97-1。虽然大多数已有报道主要聚焦于重症病例，轻症疾病导致的发病率和后遗症也很高。例如，登革热患者(疾病的轻症形式)可导致患者超过 1 周不能参加工作或者学习或更有甚者其疲劳和全身乏力的后遗症有时可以持续数月[27]。更为极端的情况，一些虫媒病毒感染可引起永久性的不可逆损害。例如，基孔肯雅病可引起严重的关节痛和手脚功能丧失，而且可能是不可逆的[28]。严重的西尼罗病毒病可以引起类似脊髓灰质炎样神经症状，包括行动困难，可能导致神经系统永久性损伤[29]。与脊髓灰质炎病毒感染类似，脊髓前角神经元也容易感染西尼罗病毒。孕期感染 ZIKV 的孕妇多达 1/10 可能会生下有先天性缺陷和特殊神经异常的婴儿，如小头畸形[30]。此外，寨卡病毒还可导致成年人出现类似吉兰-巴雷综合征的严重神经系统症状[31]。

嗜神经虫媒病毒的常见临床症状有昏迷、脑膜炎、弛缓性麻痹、脑炎、小头畸形及吉兰-巴雷综合征。嗜神经虫媒病毒包括黄病毒属(JEV 和 TBEV)、甲病毒属(VEEV、EEEV 和 WEEV)和布尼亚病毒属(Bunyavirus，LACV)。神经致病机制包括两个重要而不同的因子：神经侵袭力和神经毒力。神经侵袭力是指病毒入侵中枢神经系统(central nervous system，CNS)和(或)外周神经系统(peripheral nervous system，PNS)的能力。神经毒力是指病毒在 CNS 和(或)PNS 神经元或胶质细胞中复制的能力。黄病毒属中的 JEV 和 TBEV 血清亚组已经适应了在神经系统中进行复制。已有报道许多非嗜神经虫媒病毒导致了脑炎

病例，且这些病毒并不具有嗜神经性，但这些脑炎通常发生在与死亡病例相关的多器官衰竭期（表97-1）。包膜糖蛋白是黄病毒属嗜神经特性的一个重要决定因素，与包膜基因表达产物的糖基化变异有关。重症黄病毒感染的最重要宿主危险因素是年龄、遗传、免疫低下状态及已有的抗黄病毒免疫。大多数黄病毒感染为无症状感染或隐性感染，神经侵袭性疾病的发生率通常≤0.1%，但随着病毒在人群中的流行而发生变化。比如在2002年美国WNV传播季节的高峰期，每150例感染者当中就会有1例感染者发生神经侵袭性疾病，死亡率为5%～10%[32-33]。在非流行年份，神经侵袭性疾病的发病率有所下降，然而2012年为流行年份，其神经侵袭性疾病的发病率与2002年病毒在美国流行时相当[34]。

人类临床研究和动物模型研究均证实了年龄是最常见的宿主危险因素。越是年轻的个体就越容易发生神经侵袭性疾病，这意味着正在发育的神经系统对病毒更加易感。例如，JEV感染所致脑炎和重症病例主要发生于0～9岁儿童。对于WNV，神经侵袭性疾病的发生随着年龄的增长而增多。越是年轻的患者无菌性脑膜炎的发生风险就越高，而老年患者更容易发生预后较差的脑炎。对于老年人而言，发生神经侵袭的风险主要与免疫系统受抑制或现有的健康状况有关。之前的身体状况，如自身免疫性疾病、糖尿病及肥胖是一些与西尼罗及登革严重疾病相关的危险因素[35-36]。这些导致免疫系统功能和应答水平降低的状况也与老年人的疫苗反应性降低有关。

对于大多数虫媒病毒的宫内传播研究很少，然而，2015年美洲寨卡病毒的暴发首次促进了相关研究，这些研究详细阐述了该病毒的宫内传播[37]。对孕期不同阶段感染ZIKV的孕妇进行队列研究证实了新生儿发育异常伴特异性神经损伤。这些研究表明，胎儿或新生儿有严重的大脑萎缩、脑室扩大和颅内钙化，可见于宫内超声图像和分娩之后。虽然研究焦点主要集中在小头畸形的发生上，但宫内暴露ZIKV所导致的发育畸形有很多种，统称为先天性寨卡综合征（congenital Zika syndrome，CZS）。CZS可分为5类，包括神经、肌肉骨骼、眼部、泌尿生殖系统和其他不可归类的特殊类别[20]。其他研究也发现病毒从受感染的母亲传播给胎儿（经胎盘传播），如DENV和WNV，但出生后并不产生严重后果[38-39]。

嗜内脏虫媒病毒包括但不限于DENV、YFV和裂谷热病毒（Rift Valley fever virus，RVFV）（表97-1）。感染这些病毒的常见临床症状有发热、乏力、头痛、畏光、偶有皮疹和关节痛。其他症状还包括肝炎和黄疸，有时会被误诊为是肝炎病毒感染。这些病毒特有的临床表现是出血和休克综合征，只有相对少的患者（1%～5%）会在病程中发生出血，其中0.5%～5.0%的患者发展为多器官衰竭，最终死亡[40]。其他一些表现为病毒性出血性综合征的病毒性疾病，如拉沙病毒（沙粒病毒）、埃博拉和马尔堡病毒（丝状病毒）等，可能会被误诊为出血性虫媒病毒综合征。然而，虫媒病毒和其他出血性病毒感染还是存在许多临床差异的，再加上地域限制性，均有助于正确的临床诊断。

因为每种虫媒病毒很少有特征性症状，所以在感染早期急性期，非特异性临床症状常导致误诊。其他一些有预防措施或疫苗可预防的疾病，如风疹/麻疹、流感、钩端螺旋体病和疟疾等，均曾被误诊为虫媒病毒感染。临床误诊会延误患者的治疗和分诊。嗜内脏虫媒病毒最常见的误诊就是疟疾和钩端螺旋体病。在实验室确认疟原虫感染之前，通常对疑似疟疾感染患者进行抗疟预防治疗。虽然对感染虫媒病毒的患者进行抗疟治疗尚没有发现副作用，但也没有数据支持这一结论[41]。某些虫媒病毒感染相关的脑炎和出血症状则有助于准确的临床诊断。

对于多数虫媒病毒而言，用于预防和治疗的疫苗和抗病毒药物都很有限（表97-1）。临床医生主要依赖补液、止痛和输血液制品等支持性治疗。在诊断虫媒病毒感染时，临床医生要始终考虑发生感染的地理位置，同样要考虑到患者的各方面信息，如疫苗接种史，旅行史和媒介暴露史等。虽然许多虫媒病毒在特定的地理区域内传播，但其他一些虫媒病毒如DENV，由于其快速的地域扩张，目前已流行于世界上大多数热带和亚热带地区。通过综合已知的病毒潜伏期、基于病毒地域分布的感染风险及合适的媒介是否存在，可以大幅度缩窄临床诊断范围。虫媒病毒可以与共传播的虫媒病毒、其他感染性疾病或寄生虫病（如钩端螺旋体病、流感和疟疾）并发感染[42-44]。由于研究的样本量太小没有办法进行统计，所以没有明确的证据表明并发感染会导致更高的发病率或死亡率。

五、标本采集、运输和储存

血清是诊断虫媒病毒最常采集的标本，疑似虫媒病毒感染的急性期患者还可以采集如全血、尿、精液、组织和唾液等其他标本，各有不同的用途。在出现症状或发热后的 120 h(5 天)内，可在感染患者的血清中检测到嗜内脏虫媒病毒，但也有例外，如 ZIKV 在发病后多达 20 天[发病后天数(DPO)]仍可检测到[45]。核酸扩增试验(NAAT)是最特异和最敏感的病例确诊试验，但对嗜神经病毒来说，检测血液中的病毒核酸往往很困难。血清样本的采集使用红色或虎皮色顶盖的血清分离真空采集管，而全血样本的采集使用 EDTA 处理的真空采血管。其他的采血方式还有干血斑采集，然而只有很少的研究对该技术进行了验证[46-47]。为了保证核酸的完整性，在病毒血症期(发病后 0～5 天)采集的标本应保存在－80℃。样本冻融会引起 RNA 迅速降解，显著降低病毒滴度，比如单次冻融循环可降低达 1 个对数数量级。由于人类是 DENV、CHIKV 或 YFV 等几种病毒的主要增殖宿主，这些病毒在血液和组织中的滴度达 10^3～10^9 个基因组拷贝/ml，可以被大多数分子诊断试验所检出。对于嗜神经虫媒病毒，如 WNV、圣路易斯脑炎病毒和 JEV，它们具备中间宿主(禽或猪)，人类为终宿主。对于这些病毒而言，由于病毒滴度较低(10～1000 PFU/ml)，可能低于许多逆转录-聚合酶链反应(reverse transcription-PCR，RT-PCR)的检测限(limit of detection，LOD)，所以通过血液进行病毒鉴定是不大可行的[48]。对于临床诊断为脑炎或脑膜炎的患者，应当检测脑脊液样本(cerebrospinal fluid，CSF)中是否含有病毒特异性抗体(IgM)[49]，根据患者的免疫状态或样本采集时间，可通过 RT-PCR 检测脑脊液中的病毒核酸或进行病毒分离培养。这些诊断试验的敏感性取决于感染的病毒和标本采集时间。对于在神经侵袭或脑炎症状发生之前发现的病例，采集血液标本比脑脊液标本更有可能获得阳性结果。为了能够检测到更低滴度的虫媒病毒，最近 PCR 技术的改进提升了许多这些 NAATs 的检测限。一些研究表明，虫媒病毒可以在体内长时间存在，在数周或数月内仍可检测到排毒，特别是 WNV，科罗拉多蜱热病毒(CTFV)和 ZIKV[50]。对于 ZIKV，病毒持续时间因标本类型而异，在精液和尿中可持续数周至数月，表明病毒持续存在于前列腺和肾等组织中[51]。

用于免疫学诊断的血清标本应在急性期(发病后 0～5 天)和恢复期(发病后 6～14 天)采集双份。配对标本通过检测 IgM 或 IgG 证实血清学转换是最可靠的确认实验。疑似嗜神经虫媒病毒感染者来源的 CSF 样本 IgM 抗体比血清 IgM 抗体可以更早检出。然而为了获得最好的实验结果，2 种样本(血清和 CSF)均应采集。单次血清样本 IgM 阳性虽然能诊断为近期虫媒病毒感染，然而不能诊断为急性感染，因为有些虫媒病毒(如 WNV 和 ZIKV)的 IgM 应答持续时间较长(图 97-2)[52]。然而，脑脊液标本单次 IgM 阳性提示急性虫媒病毒感染。

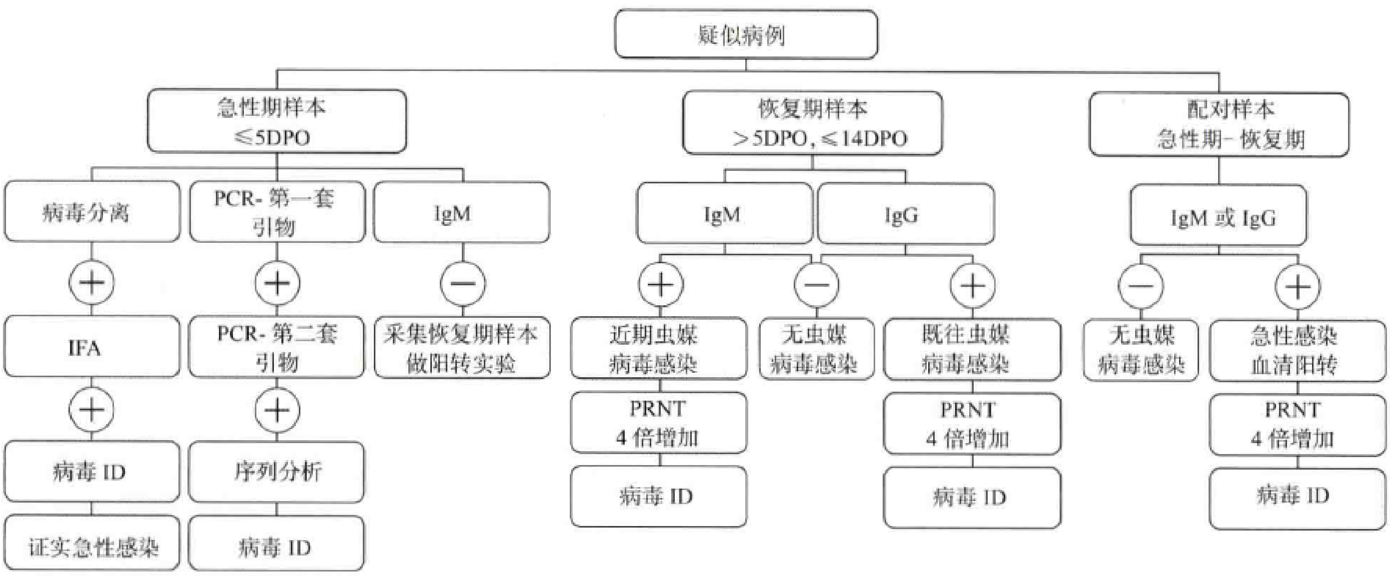


图 97-2 疑似虫媒病毒感染的人类血清样本的最佳检测流程。对于神经侵袭性疾病，当患者出现神经症状时，可在脑脊液中检测到 IgM，PCR 结果可能为阴性。所述方法仅在专门的虫媒病毒参考实验室使用

从死亡病例采集的尸体组织标本可用于直接检测。这些组织包括大脑、心脏、肾、肝和胎盘。其他采集的用于诊断试验的样本还有节肢动物，如蜱、蚊、白蛉和蠓等。这些样本可用于病毒分离和(或)病毒核酸检测。用于对媒介中病毒进行鉴定的节肢动物实验有快速测试法，如使用直接针对病毒抗原(如包膜糖蛋白)的抗体试纸条，其中市售的有 WNV、DENV、EEEV 和 RVFV 检测试剂[53-55]。

样品在理想状态下应快速转运，并在冷冻条件下干冰运输。如果能在样品采集 24 h 内送达的话，最好将样品保持在 4℃以避免反复冻融，并且在样品到达实验室后立即进行检测。由于样本具有潜在感染性，特别是单正链 RNA 病毒，确诊样本或分离株的运输应遵循国际航空运输协会条例，采用三层包装方法，来自疑似病例的样本可按照常规确诊样本的同样方法进行包装。应使用适当的个人防护用品，按照《微生物和生物医学实验室生物安全手册》(BMBL)(http://www.cdc.gov/biosafety/publications/bmbl5/)的规定，在生物安全 2 级(biosafety level 2，BSL2)或生物安全 3 级(BSL3)实验室处理样本，同时在Ⅱ级生物安全柜中进行操作。通过 57℃热灭活或裂解液灭活的样本通常可以在生物安全柜外进行处理。检测后的标本应在－80℃长期储存。对于病毒阳性或免疫检测阳性的样本，最好于－20℃长期储存，最长可储存 20 年。

六、直接检测

(一)显微镜检查

采用免疫组织化学对病毒进行鉴定的标本是活检或尸检的组织样本。组织样本的采集种类主要根据疑似感染的虫媒病毒进行。因为世界上一些有虫媒病毒传播的地区不执行尸检和(或)文化上不能接受尸检，所以虫媒病毒相关死亡的病理研究相对较少。死亡病例最完整的病理信息主要都是来自黄病毒引起的死亡(如 JEV、WNV、YFV 和 DENV)。特定组织样本的采集是由病毒的嗜性决定的，同时又随着虫媒病毒科和病毒种的变化而不同。对于感染 CNS 的嗜神经病毒，采集组织样本并检测病毒抗原或病毒核酸的存在，CNS 的采样区域包括皮质、小脑和脑干。JEV 感染时，脑的尸检主要是采用核酸扩增试验对组织样本进行检测，并通过细胞培养病毒分离技术进一步确认[56-57]。对于嗜内脏病毒如 DENV 和 YFV，则采用其他器官如肝、肾、淋巴结、脾和心等[58-59]进行免疫组织化学和 RT-PCR 检测。关于甲病毒属和布尼亚病毒属的病理研究鲜见发表。在福尔马林固定和石蜡包埋的组织中，可采用另一种检测方法即巢式 RT-PCR 技术来检测组织样本中的病毒基因组[60-61]。

(二)抗原检测

靶向结构蛋白的病毒抗原检测试验已成为节肢动物标本快速病毒鉴定的现场试验[55, 62-63]。所有快速诊断试验阳性的节肢动物标本需进一步采用 RT-PCR 或病毒分离进行确认。已开发的病毒(如 RVFV 和 EEEV)酶联免疫吸附试验(enzyme linked immunosorbent assays，ELISAs)主要用于蚊虫标本的检测[64-65]。其他一些抗原检测试验可检测人血清中 DENV 和 ZIKV 的非结构蛋白 1 (NS1)抗原。黄病毒的 NS1 糖蛋白可诱导体液免疫应答，被称为补体结合抗原。NS1 是病毒复制的关键，以 3 个二聚体亚基组成的六聚体形式分泌，采用 ELISA 法很容易检测。已开发的微孔板 ELISA 检测 NS1 抗原的方法可同时用于检测人体和蚊虫标本。由于比 RT-PCR 更加方便，这些方法已被广泛应用于诊断。

登革热病毒 NS1 蛋白 ELISA 可以在许多资源贫乏的国家用于病毒监测。第一个 DENV NS1 抗原捕获 ELISA 方法的敏感性范围介于 1～4 ng/ml，而商业化试剂盒的敏感性约为 50 ng/ml 血清[66-68]。早期研究结果表明，DENV 患者的血 NS1 蛋白水平与疾病的严重程度相关，尽管这些研究结果并没有获得后续研究的证实[67-68]。关于 DENV NS1 的研究表明，抗 DENV NS1 抗体结合于毛细血管内皮细胞上，引起毛细血管渗漏[69]。NS1 糖蛋白具有 DENV 血清型特异性抗原表位，通过 ELISA 可以区分 DENV 的不同血清型[70]。然而，由于多次 DENV 暴露会形成免疫复合物，使得 NS1 抗原检测在二次 DENV 感染时变得不敏感[71]。DENV 的 NS1 检测试剂盒在市场上可以买到，许多研究者都对其敏感性(60%～75%)和特异性(71%～80%)进行了评价[72-75](表 97-2)。因为与检测 IgM 相比，检测 NS1 更加特异，

所以它也可以用于区分不同的黄病毒感染。然而，JEV 血清亚组的病毒不能产生像 DENV 感染时所观察到的足够高的病毒滴度，所以不大可能将 NS1 抗原检测试验用于这些虫媒病毒感染的临床诊断。

NS1 抗原测定还可用于 ZIKV 检测。利用其他黄病毒与 ZIKV NS1 抗原的同源性可以区分 ZIKV 和其他黄病毒如 DENV。ZIKV NS1 ELISA 对非流行区和流行区病毒的检测敏感性分别为 31.6%和 85.7%[76]。在病毒血症期采集血清标本以优化检测窗口，因为此时的病毒蛋白滴度最高。

(三)核酸检测

用于检测虫媒病毒核酸的 NAAT 种类很多，包括常规和实时 RT-PCR(real-time RT-PCR，RT-PCR)、巢式 PCR、逆转录-环介导等温扩增(reverse transcription loop-mediated isothermal amplification，RT-LAMP)、SYBR green Ⅰ试验及 TaqMan 阵列的应用。任何 NAAT 的敏感性均取决于目标 RNA 模板提取和纯化的效率。酚-氯仿提取技术由于纯化过程中存在 RNA 降解会产生不一致的结果，而商品化提取试剂盒改进了这一缺陷。新的商品化试剂更快，更可靠，提取的 RNA 更稳定且避免了目标 RNA 的降解。NAAT 的唯一缺陷是目的分析物或扩增产物的潜在实验室污染。将无模板或洁净实验室与核酸扩增实验室分开可以消除潜在污染。NAAT 能够快速地确诊感染病毒，然而这些方法并不一定能在临床实验室使用，通常应用于专业实验，如 CDC、参考实验室和学术实验室。

1. RT-PCR 常规的 RT-PCR 采用凝胶电泳，将试验样本产生的 DNA 片段大小(kb)与已知病毒标准品扩增的 DNA 片段大小进行比较。凝胶电泳使用溴化乙锭作为检测方法，该方法不能用于核酸定量，其检测敏感性取决于溴化乙锭的检测限(1～5 ng 核酸)。常规 RT-PCR 中最为敏感的方法为巢式 RT-PCR。DENV 巢式 RT-PCR 的敏感性几乎与 rRT-PCR 相当，对 DENV 血清型的检测在某些情况下其敏感性比 rRT-PCR 还高[77]。

采用荧光标记探针的 rRT-PCR 已成为一些实验室的常规技术，这是因为它操作简单(扩增后不需要开管，减少了污染的风险)、敏感性高、可多重检测，而且能够对病毒滴度进行定量。为了获得最佳特异性，引物和荧光探针根据基因组的保守区进行设计。只有当引物的特异性存在不确定性时，才会使用第二套引物和(或)测序来确认 RT-PCR 的结果。然而，这些增加的检测并不是必要的(图 97-2)。通过使用保守序列(如黄病毒属、甲病毒属和布尼亚病毒属)，某些检测方法被设计成能够检测一个特定病毒属内的所有病毒，称之为“泛或通用 PCR”[78-79]。这些泛/通用引物对于疑似病原为虫媒病毒的新发传染病病原体检测非常有用。一旦未知病毒的属被确定之后，便可以采用属内各个种特异性的引物来鉴定和确认感染的病原。荧光以循环阈值的形式被测量和捕获，该值通常与基因组当量拷贝或 PFU 相关，通过标准曲线计算以推测标本中的病毒载量。

为了满足近来对虫媒病毒多重检测的需求，研究人员建立了许多检测方法，如 DENV(多重血清型)检测方法，以及单管 rRT-PCR 检测 CHIKV 和 DENV 2 种病原，或同时检测 CHIKV、DENV 和 ZIKV 3 种病原的方法[80]。在多种虫媒病毒或多种血清型登革热病毒流行的地区，这些多重检测方法特别有用，因为医生在临床上无法区分感染的病原体。多重检测技术的唯一缺点是它们的检测敏感性往往低于单重检测法。另一种通过单反应检测多病毒靶标的方法是使用 TaqMan 阵列卡(TaqMan array card，TAC)，在一张卡片上可以检测多达 40 种病原体，可将多种虫媒病毒的检测体系以单重 rRT-PCR 的方式点样到检测卡上。通过微流控技术，样本流入各个装有对应于每一种靶标病原的冻干引物和探针的检测孔中。由于每张 TAC 所使用的样品体积较小，所以该方法的检测敏感性低于大多数 rRT-PCRs 甚至是多重 rRT-PCRs。该技术的主要优点就是能够在一次试验中检测多种相似的病原体[81]。

2. RT-LAMP 目前已建立了多种虫媒病毒 RT-LAMP 核酸检测技术。该方法仅仅需要一个标准的温度(64℃)，因为该技术不需要热循环，所以被认为是一种常规和 rRT-PCR 的廉价替代方法。通过使用 *Bst* 聚合酶代替 *Taq* 聚合酶，该反应是一种链置换反应，使用 4 种不同的引物，识别目标基因的 6 个不同区域。扩增产物可以通过白色沉淀或 SYBR 绿染料产生的黄绿色颜色改变进行可视化鉴

定。WNV、JEV、CHIKV、DENV 及 RVFV 均已建立了 RT-LAMP 检测技术[82-85]。一种新开发的利用简并引物的 RT-LAMP 技术对 YFV 的检测具有高度敏感性，在急性感染前 4 天其检测敏感性为 83%～100%，检测限为 19 PFU/ml[86]。在常规 RT-LAMP 反应中使用简并引物可增加其敏感性，使其达到或超过许多常规分子诊断试验[如 RT-PCR(61.5%)、RT-巢式 PCR(93.8%)、定量 RT-PCR(100%)和常规 RT-LAMP(63.1%)]。

(四)分离程序

虫媒病毒通常从受感染的人和动物的血清样本或蚊虫提取物中进行分离。病毒分离可以作为 RT-PCR 阳性标本的确证试验，有助于在分子流行病学研究中进一步阐明流行株的特征。只要是通过适当的处理和保存维持了样本的完整性，大多数虫媒病毒都可以从血液或组织中获得分离。这些病毒需要不同级别的生物防护(BSL2 或 BSL3)，实验室应当遵循 BMBL 手册进行适当的生物安全操作。随着测序能力的提高，并不一定都要进行病毒分离，因为病毒在细胞培养中的多次传代可能会导致测序结果发生偏倚。代次低的病毒更适合系统发生分析，因为这些病毒以 1×10^{-3} 置换/位点/年的速度在突变。有趣的是，与其他所有 RNA 病毒相比，虫媒病毒的平均突变率要低 0.21 个数量级，其同义突变发生率也更低[87]。尽管如此，获得病毒分离株作为未来分子特征研究的参考毒株仍然很重要。当 RT-PCR 阳性样本不能通过种特异性 RT-PCR 进行分类的时候，病毒分离还可以用于鉴定新病毒。例如，采用黄病毒属通用引物进行 NAAT 鉴定为阳性的样本不能被黄病毒属内种特异性 RT-PCR 所检出时，可通过病毒分离和测序来确定该病毒是否是这个病毒科/属中的新病毒。

虫媒病毒分离可以采用原代细胞培养或传代细胞系培养。原代培养通常采用原代鸭胚细胞、鸡胚细胞，以及猴和仓鼠肾细胞。用于病毒分离的常见哺乳动物细胞系有 Vero、LLCMK2、BHK-21、CER、SW13 和 PK 细胞。细胞感染虫媒病毒后可以引起特征性的细胞病变效应(CPE)[如蚀斑、细胞融合和(或)形成合胞体]。CPE 的模式可以帮助确定病毒的属及可能的病毒科。另一种病毒扩增技术就是将样本接种于 2～3 日龄的乳鼠脑(SMB)。当有病毒存在时，小鼠会在接种两周内发生瘫痪和死亡。少数情况下病毒需要在 SMB 内经过多次传代才能神经适应。感染小鼠的其他器官标本如肝和肾也应同时采集，因为某些正布尼亚病毒在鼠肝中复制滴度要比脑内高。将受感染的匀浆组织接种至细胞后需要在细胞内进行多次病毒传代才能让病毒分离株适应细胞培养。

许多蚊媒虫媒病毒，包括 DENV 和辛德毕斯病毒，还可以直接接种至蚊体内(如伊蚊、库蚊和巨蚊等[88])或蚊虫细胞内(如 C6/36 和 AP61 细胞[89-90])进行扩增。有时这些病毒在蚊虫细胞株中能够产生持续性的感染却没有明显的 CPE。处理蚊虫细胞转染时需要进行质量控制以监测持续性感染。

当标本提交至参考实验室进行病毒分离和鉴定时，参考实验室会根据样本的采集地点，基于该地区已知的流行病毒，采用多个细胞系进行病毒分离。通常细胞培养时将标本接种到至少一种蚊虫细胞株(C6/36)及不同的哺乳动物细胞株，特别是 Vero 细胞、LLC-MK 细胞和 BHK21 细胞。然后每天监测接种的细胞培养瓶是否发生 CPE，在整个病毒生长过程中细胞培养瓶内要维持一个中性的 pH 环境。酸性环境(pH<6)会导致病毒结构蛋白的构象发生改变，使得病毒失去感染性。如果没有发生 CPE，培养的样本将采用病毒特异性 PCR 检测和(或)免疫荧光实验(immuno fluorescent assay，IFA)检测是否存在病毒抗原，通过交叉反应单克隆抗体(monoclonal antibody，MAb)来鉴定病毒的科/属。病毒分离物储存在包含 10%～20%胎牛血清的细胞培养基中，并保存于－80℃，以便用于以后的病毒特性研究。当前，许多实验室不允许采用 SMB 接种法，因为实验动物管理和使用委员会禁止使用这种病毒扩增方法。如果从人和动物血清分离病毒，一般采用未稀释的血清和 10^{-1}、10^{-2} 2 个稀释度的血清(为了避免高病毒滴度标本中病毒的干扰)接种易感细胞。如果收到组织标本，在样本匀浆之后根据重量体积进行稀释(10%～20%)。

七、鉴定

使用针对病毒结构基因产物的特异性 MAbs 通过 IFA 鉴定感染细胞中的病毒(可以是细胞培

养也可以是组织样本），因为结构基因在物种中最为保守（图 97-3）。使用种特异性 MAbs 并不能区分基因型或谱系，只能用于种特异性的病毒鉴定。也可以先用多克隆抗体确定病毒科，再通过种特异性 MAbs 进行检测。一些 MAbs 可以与一个病毒科/属内所有种的表位发生交叉反应，这些广谱的具有交叉反应性的 MAbs 或多克隆抗体可以鉴定病毒科，然后进一步采用特异的、种内保守的、针对结构蛋白表位的 MAbs 进行检测。由于背景信号和非特异性的抗体反应，IFA 的局限性就是假阳性实验结果。IFA 主观性较强，受实验者技术水平影响较大。对于不同的组织标本，荧光标记抗体所产生的背景差异很大。某些脂质含量高或富含甲壳素（与昆虫外骨骼相关的蛋白质）的样本会自发荧光。基因序列分析可以确切地区分科内的不同种的病毒和不同血清亚型的病毒，能够确定病毒的起源及其分子流行病学。系统发生和时空分析可以帮助追踪病毒在一个地区或整个世界的传播情况[91]。该分析可以明确特定的病毒进入一个地区的速率及其进化速率。由于虫媒病毒的进化与宿主、媒介相互依赖，系统发生分析不能预测虫媒病毒为了增加对宿主和媒介适应性所作的主要进化改变[14]。

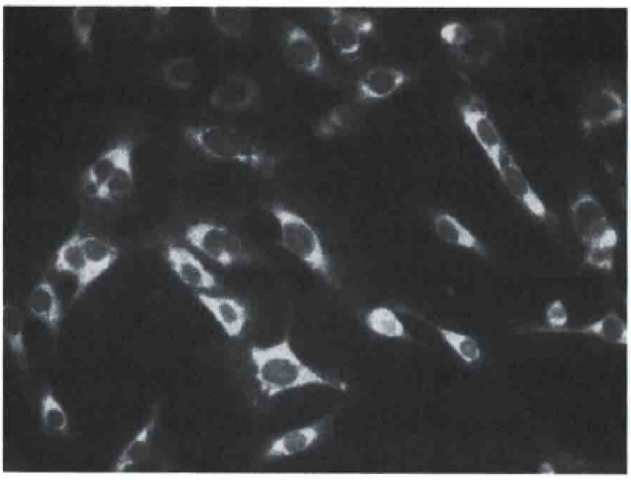


图 97-3 WNV 感染 Vero 细胞的 IFA 检测：采用黄病毒组特异性鼠 MAb(6B6C1)作为一抗，荧光染料（6-羧基荧光素）标记的抗小鼠 IgG 作为检测抗体，见彩插

用于病毒鉴定的新方法，如深度测序、超深度测序或扩增子测序（同一 DNA 靶扩增子多次测序以找到低频突变），增加了从组织、节肢动物或血液中鉴定新病毒科或种的可能性。测序具有在载体或脊椎动物宿主中已知病毒新亚型或新的病毒种感染人类之前，就可对它们进行鉴定的优势。快速进化的病毒感染作为其扩增宿主或终宿主的人，对他们进行快速鉴定，可以为制定预防和控制措施提供保证。例如，Swei 等[92]在 24 h 内重建了一种新发现的病毒，这比传统的测序技术要快得多。这些研究人员发现了布尼亚病毒属中的孤星病毒，该病毒由美洲钝眼蜱所携带，与造成密苏里农民发病的哈特兰病毒相关[25]。

八、血清学试验

(一)血细胞凝集试验

血凝抑制试验（hemagglutination inhibition assay，HIA）是诊断虫媒病毒的经典试验，是在基因组测序之前进行病毒科分类的基础。Clarke 和 Casals 于 1958 年首次描述了该试验，从 1980 年开始可以用微孔板操作[93]。HIA 不具备抗体同种型特异性，所以不能区分 IgM 和 IgG。血清样本中抗虫媒病毒的宿主抗体的存在抑制了鹅红细胞凝集，导致红细胞在 96 孔板中呈按钮样外观。阳性 HIA 的效价判定受试验中所用阳性对照的效价和感染状态（原发感染还是同一属虫媒病毒的二次感染）的影响；HIA 的结果具有主观性，受操作实验的实验室技术员经验所影响。

HIA 的主要优点是可以进行多宿主监测，因为该试验不具有物种特异性。因此，需检测多种共循环虫媒病毒的实验室多采用 HIA 进行脊椎动物哨点监测。由于 HIA 的试剂和缓冲液的标准化存在困难，以及鹅红细胞的有效性问题，在人群样本的检测中，ELISA 已经基本上取代了 HIA。此外，HIA 的结果解释具有主观性，而且同一组或亚组病毒之间的交叉反应性会导致非特异性结果。

(二)酶联免疫吸附试验

1. IgM 在虫媒病毒感染后获得性免疫应答产生 IgM 抗体。IgM 抗体在感染晚期和恢复期也可以检测到，所以 IgM 抗体的存在仅仅表明有急性感染或近期感染的迹象。在感染的急性期（发病前 5 天），只有小部分患者（≤10%）可以检测到 IgM 抗体，但不同的感染天数，不同的患者和病毒都会有不同的表现[94]。IgM 抗体滴度的峰值出现在感染恢复期（发病后的 6～14 天），这

一时期采用 ELISA 法检测可以获得最为可靠的结果。

IgM 抗体捕获(IgM antibody capture,MAC)ELISA 法是大多数诊断实验室和商业诊断试剂盒的首选,主要原因有 2 个:首先,MAC ELISA 法是在微孔板中使用抗人 IgM 抗体来捕获 IgM 抗体,所以最大限度地减少了高亲和力的 IgG 抗体与抗原的结合;其次,MAC ELISA 法排除了非特异性抗体的结合,使得不同来源的抗原都可以使用,包括由许多病毒抗原混合物组成的未纯化的异源蛋白。在 MAC ELISA 中,过量的抗原与具有广泛交叉反应的 MAbs(通常是虫媒病毒组特异性的)组合使用增加了检测的敏感性。MAC ELISA 法的另一个优点是可以通过互换抗原来比较同一科不同虫媒病毒间的患者抗体应答,因为偶联检测分子的 MAbs 具有广泛的交叉反应性。MAC ELISA 法的检测敏感性较高,但其特异性会受到共循环虫媒病毒的交叉反应性影响而发生变化,例如,在 DENV 和 JEV 流行地区,IgM ELISA 的检测结果存在高度交叉反应,需要进一步通过中和试验进行确认。

MAC ELISA 法的检测敏感性和特异性受到抗原的来源、检测抗体、偶联的发色基团、血清条件(不可接受的血清样本包括溶血样本、脂血样本或细菌、真菌污染样本)和样品的稀释度等多个因素的影响。MAC ELISA 中所使用的病毒抗原可以将病毒接种至 SMB 制备、从病毒感染细胞裂解物制备和(或)在细菌表达载体中生产重组抗原。在 MAC ELISA 中,使用 SMB 来源的抗原敏感性最高,因为该抗原是由高滴度的病毒抗原混合物组成的,但由于抗原不纯导致其特异性最差。相反,使用具有免疫原性的结构基因重组抗原时敏感性较差但特异性更好。重组抗原保持虫媒病毒结构蛋白的天然构象或糖基化状态对于抗体结合尤为重要,保持蛋白质天然形态的重组抗原能够提供最敏感和最特异的实验结果。

IgM 动力学随着虫媒病毒的科、属、种及感染状态而发生变化。例如,DENV 二次感染患者(>1 次感染)的 IgM 滴度比初次感染时要低[95]。在这些无法检测 IgM 的特殊情况下,IgG 的血清转换可以用作血清学确证试验[96]。其他不典型情况,如 WNV、ZIKV 和 JEV 感染时,IgM 应答可以持续 3 个月以上甚至长达 1 年[45,97-99]。虫媒病毒感染时 IgM 抗体的持续存在促使 IgG 抗体亲和力试验的开发以评估感染状态(急性感染、近期感染或者是既往感染)[100]。

对于致脑炎的虫媒病毒,检测脑脊液中的 IgM 抗体与血清中的 IgM 抗体是不同的。JEV 感染时,在发病后 9～13 天可以在血清中检测到抗 JEV IgM 抗体,而脑脊液中的 IgM 抗体最早在发病后 1 天就可以检测到[101]。Burke 等[102]发现,当只使用 HAI 作为诊断试验来确认临床血清标本中的 JEV 时,与 MAC ELISA 相比,HAI 的漏检率达 34%。此外,抗 JEV IgM 抗体能够在脑脊液中维持长达 1 年时间,提示中枢神经系统的病毒感染是持续性的[103]。

免疫荧光同样可以用于间接 IgM 抗体检测,用以评价机体对虫媒病毒的反应。将虫媒病毒感染细胞固定于玻璃载玻片上,然后滴加患者的血清样本,孵育之后,洗涤数次以去除血清中多余的抗体后,滴加荧光标记的抗人 IgM 或 IgG 单克隆抗体。结果通过显微镜分析观察荧光染色的细胞来确定(表 97-2)。

市售的虫媒病毒 IgM ELISA 检测试剂具有不同的检测敏感性和特异性(表 97-2)。参考实验室和公共卫生实验室可以使用实验室自行开发的 IgM 抗体检测试剂。对于一些医学上重要的虫媒病毒如 ZIKV、WNV、JEV、YFV 和 DENV 而言,有许多市售的 IgM 检测试剂可以购买[104-106]。与金标准或参考方法相比,有些市售的试剂盒具有非常好的检测敏感性和特异性。在使用商业化试剂之前,每个诊断实验室应该对该试剂进行一次全面的、独立的评价[107]。

2. IgG 样本中抗虫媒病毒 IgG 抗体的存在代表以前虫媒病毒感染所诱导的长期获得性免疫力。初次感染后长达 60 年后都可以检测到 IgG 抗体[108]。检测 IgG 抗体的主要方法有 2 种:直接 ELISA 和间接 ELISA。直接 IgG ELISA 不如间接 ELISA 敏感,而且需要纯化的病毒抗原。间接 IgG ELISA 更加敏感,它使用捕获抗体将病毒抗原固化于固相表面。这一捕获步骤对于感染 SMB 来源的未纯化病毒抗原尤为重要,因为这种抗原如果不进行捕获和浓缩,免疫原性就会很低[109]。在间接试验中,将样本加至被捕获的病毒抗原上,而后采用抗人 IgG 酶标二抗进行检测。间接 IgG ELISA 因为操作简单和特异性更强已经基本上取

代了 HIA。IgG ELISA 的结果报告可以是定性结果、定量结果或终点稀释度结果[96,109]。然而由于病毒科内病毒种间的交叉反应,使得 IgG ELISA 缺乏特异性,在进行病毒鉴定时可能需要额外的确认试验如中和试验。由于 IgG ELISA 会结合所有抗虫媒病毒 IgG 抗体(中和或非中和抗体),所以该方法往往比虫媒病毒空斑减少中和试验(plaque reduction neutralization test,PRNT)更敏感但不特异。另外一种检测血清 IgG 的方法就是之前所描述的 IFA(表 97-2)。

研究人员已经开始使用结构抗原代替包膜蛋白来提高黄病毒属 IgG ELISA 的检测特异性。Cardosa 等[110]证实,前膜蛋白的 IgG 应答对于区分 DENV 和 JEV 具有更好的特异性。其他研究人员通过使用一种位于包膜蛋白 N-末端部分的重组多肽提高了 IgG ELISA 的检测特异性[111]。IgG 抗体亲和力 ELISA 对于鉴别初次和第 2 次黄病毒感染是有效的[112-113]。亲和力试验严格使用 3～6 M 尿素作为洗涤缓冲液以去除非特异性 IgG 结合。在 IgM 应答持续存在的特殊情况下,这一严格的洗涤步骤对于鉴别急性和既往虫媒病毒感染非常有效[110,114]。

IgG 抗体亚类已经被研究用作疾病严重程度的指标[115-117]。对于 JEV,IgG1 抗体亚类是临床确诊为脑炎病例 CSF 标本中含量最高的抗体。Thakare 等[115]在 JE 患者的血清或 CSF 中未能检测到 IgG2 抗体,所以推测 IgG1 抗体亚类比其他 IgG 抗体亚类具有更强的细胞亲和力,在病毒清除过程中可能更有效。对于 DENV 感染患者,IgG1 和 IgG4 抗体亚类是发展为登革出血热和登革休克综合征(疾病的严重表现)的危险指标[116-117]。

3. 中和反应 PRNT 是判定型特异抗体最特异的血清学工具,最常用于确认免疫诊断试验结果,以确定恢复期血清中感染的虫媒病毒[118]。这一实验利用了病毒和抗体在体外的特异性相互作用,导致病毒失活,使其不能在细胞培养中感染和复制。PRNT 结果以血清对特定病毒的中和抗体终点滴度的形式表示,也可体现出对感染病毒的免疫保护水平。PRNT 的阳性滴定结果与疫苗研究中的免疫保护有关,同时也可确认 IgM-或 IgG-阳性标本中的病毒。

抗体中和在动物模型、人的自然感染和体外细胞培养实验中已得到广泛研究。中和抗体主要针对病毒的结构蛋白。黄病毒属的中和表位主要位于整个 E 糖蛋白,包括结构域Ⅰ、Ⅱ及表面结构域Ⅲ[119-121]。对于甲病毒属而言,中和表位主要位于 E2 包膜蛋白,该蛋白对于受体结合和进入细胞也非常重要。甲病毒属(如 VEEV 和辛德比斯病毒)的很多成员和罗斯河病毒糖蛋白中鉴定出相似的 E2 表位簇[122-123]。布尼亚病毒属的中和表位在 G1 糖蛋白内[124]。

病毒中和需要多个抗体分子占据病毒子表面以抑制病毒感染。这就是所谓的"多次打击"机制[125-126]。在病毒中和中同源抗体反应要比杂合抗体反应更有效。组合中和、非中和、亚中和抗体可产生协调作用。另外,DENV 和 WNV 研究中发现杂合抗体可增加病毒的进入能力[127-129]。

黄病毒同时有组特异和型特异的中和抗体决定簇。型特异的决定簇在杂合反应中可产生交叉反应性,引起血清 IgM 和 IgG 实验的交叉反应。起保护性免疫作用的中和抗体滴度还不清楚。疫苗研究为确定虫媒病毒保护抗体滴度提供了信息,比如 YFV、JEV、DENV。然而,大部分的研究数据来自减毒疫苗株的初次感染。

PRNT 的结果可提示所感染病毒,所以当 IgM 或 IgG 检测中观察到有交叉反应时可用 PRNT 实验来区分所感染的病毒。因为 PRNT 需要 5～10 天才能得到结果(病毒不同时间不同),所以不用于临床诊断。另外,由于该实验比较昂贵,需要组织培养设备和技术熟练人员,因而,该方法在大部分诊断实验室也不常规开展。要获取可靠的、可重复的 PRNT 结果,实验室必须使用标准的病毒株和细胞系。不幸的是,对于实验中可判定阳性结果的抗体诱导噬斑减少的百分比目前还没有达成共识。不同的实验室设定的噬斑减少标准也不同,如 50%,70%或 90%。不同的设定值导致不同的敏感性和特异性。因此,尽管以噬斑减少 90%为阳性标准特异性最高,但敏感性较低。疫苗研究中,以噬斑减少 50%就可保证足够的敏感性,因为人体接种减毒株产生的中和抗体水平相对较低。PRNT 实验的主要问题在于最终的使用者间需要标准化。如前所述,3 个因素可导致结果不一致:结果解释的不同(使用 50%、70%、90%噬斑减少作为标准)、实验中细胞系的不同及实验室使用的病毒株的不同。为了标准化

全球 DENV 的 PRNT，全球的项目专家已发布了 PRNT 标准化指南[130]。指南建议，病毒培养应该标准化，以便在感染后 5～7 天病毒生长平台期之前收获病毒。

九、结果的评价、解释和报告

诊断急性虫媒病毒感染的检测流程按急性期样本和恢复期样本进行区分(图 97-2)。急性期血清或 CSF 样本(≤发病后 5 天)可通过 NAAT、病毒分离、病毒抗原检测或 CSF 中脑炎病毒 IgM 检测来证实病毒是否存在。恢复期血清或 CSF 样本(发病后 5～14 天)可检测 IgM 和 IgG 抗体的出现与否。通过病毒分离、NAAT 或 IgM 和(或)IgG 阳转检测到病毒可定义为急性虫媒病毒感染。一个样本出现 IgM 阳性结果表明近期感染。然而也有一些例外，特别是 WNV 和 ZIKV 感染，其 IgM 可持续存在超过 120 天[45,99]。也有报道病毒 RNA 可持续存在的病例，特别是 WNV、ZIKV 和科罗拉多蜱热病毒。除非配对(急性期和恢复期)样本提示血清阳转，如一份样本只有 IgG 检测阳性则表明既往感染。配对样本在急性期阴性而恢复期阳性为 IgM 阳转。IgG 阳转同 IgM 阳转定义相同(急性期阴性，恢复期阳性)，或者从急性期到恢复期样本(2 次样本采样至少间隔 5 天)出现 IgG 滴度 4 倍增长也为 IgG 阳转。因为虫媒病毒属内存在高的交叉反应，总的来说，血清学结果用于确诊要有中和试验的结果证实。然而在某些情况下，由于多次接触抗原相似的病毒，PRNT 无法鉴定感染的病毒。

其他专门用于流行病学研究[包括分别用于衡量人口发病率或患病率的血清阳性率和(或)血清学调查]的检测方法，与确定急性患者的诊断不同，因此检测方法必须做相应修改。血清学调查评估虫媒病毒的流行情况和血清阳性率，以衡量人口的感染率。因为流行病学研究依赖于判定急性、近期和既往感染，检测的流程和结果解释不同需要参考其他相关信息，如旅行史、疫苗接种史、年龄和其他人口学数据，才能对特定人群的特定虫媒病毒流行情况和发病率做出准确的评估。

目前已开发了多种虫媒病毒的商品化检测试剂(表 97-2)。包括分子、抗体、抗原和 IFA 检测。试剂形式变化多样，从标准的微孔板到各种敏感性和特异性(由生产商或研究人员提供)的快速诊断试剂都有。商品化检测的优势包括对各种辅助试剂标准化，使得结果可重复，以及试剂在良好操作规范下生产。商品化试剂可为终端使用者提供更高的质量保证，质量保证通常是自制试剂(laboratory developed test，LDT)很难达到的。然而，商品化试剂可能存在质量(批次之间)和可靠性(试剂有效性)波动。当市场无利润时，生产厂家可能中断生产，导致终端使用者特别是参考实验室别无选择只有使用实验室自建项目(LDTs)进行检测。另外，同自制试剂相比，商品化试剂比较昂贵，导致使用者宁愿选择 LDTs，尽管 LDTs 比同样的商品化试剂的敏感性要低。其他方面影响使用的因素包括实验时间、储存要求、试剂稳定性和使用简便程度。

商品化试剂的使用与否取决于各个国家，因为每个国家确定试剂质量的监管机构必须批准这些试剂的销售。美国商业实验室倾向于使用美国 FDA 批准的试剂用于临床诊断。然而，只要这些试剂验证符合临床实验室改进修正案和美国病理学家协会标准的验证，这并不是强制性的。为了减少重复性工作，有些国家对于临床诊断用的商品化试剂依赖 FDA 管理批准的流程。其他国家应用自己建立的内部的评价标准。除了 DENV、JEV、CHIKV、ZIKV 和 WNV 外，大部分虫媒病毒的商品化检测试剂都没有，FDA 批准的就更少了(表 97-2)。尽管这些试剂都宣称有比较好的敏感性和特异性，然而独立的评估对于证实公司的结果非常重要。最近的研究对 DENV 的 IgM 和 NS1 诊断试剂评估发现有些公司的产品不能达到使用的要求。这些研究还发现有些试剂依赖于主观判断，如快速诊断试剂，通常由于判断人员的不同造成不同的结果[104]。因此，诊断实验室必须制定一个计划，在商业试剂用作常规诊断之前均应加以评估。

参考文献请扫二维码查阅

第98章 汉坦病毒*

JOHN D. KLENA, CHENG-FENG CHIANG, WUN-JU SHIEH

(迟莹、崔仑标 译;杨滨、汤一苇 审校)

出血热伴肾病综合征(hemorrhagic fever with renal syndrome, HFRS)和汉坦病毒肺综合征(hantavirus pulmonary syndrome, HPS,也称作汉坦病毒心肺综合征)是由汉坦病毒科正汉坦病毒属的某些成员引起的啮齿类人畜共患病。HFRS和HPS的一个显著特征是小血管可逆性的渗透性增加。该病的早期诊断对于HFRS和HPS的成功管理至关重要。

一、分类

国际病毒分类委员会(International Committee on Taxonomy of Viruses, ICTV)2016年重新划分定义了布尼亚病毒目,目前已确认正汉坦病毒属(布尼亚病毒目:汉坦病毒科)包含41个不同的种。与其他布尼亚病毒成员不同,汉坦病毒(hantaviruses)不通过节肢动物传播[1]。国际病毒分类委员会确认定义"种(species)"遵循以下4个标准:①汉坦病毒种是在一种独特的生态位中被发现的,即在不同的啮齿动物宿主品种或亚种中发现;②汉坦病毒种的S和M片段氨基酸序列至少存在7%的差异;③汉坦病毒种在双向交叉中和试验中至少存在4倍的差异;④汉坦病毒种与其他种不会自然形成重组[2]。目前,第2项标准被重新修订,除了氨基酸序列的差异外(氨基酸序列S片段相似性差异10%,M片段相似性差异12%),序列的长度和组成也被列入考虑范围[3-4]。按照新的"种"定义标准原先被认可的7种汉坦病毒种被剔除,并建议将它们列为其他被认可的汉坦病毒种的毒株[5]。在美洲[6-8]、亚洲[9]和欧洲[10]已发现这些种内的致病菌株,在非洲迄今为止只有人类感染的血清学证据[11-12](表98-1)。

表98-1 与人类疾病有关的汉坦病毒种

病毒种[a]	自然啮齿动物宿主(s)	已知的地理分布	人类疾病
主要与啮齿动物家族鼠科,鼠亚科成员相关			
多不拉伐-贝尔格莱德病毒(DOBV)	黑线姬鼠(条纹野鼠) 黄斑姬鼠(黄喉野鼠) 桥姬鼠(黑海野鼠)	欧洲中东部	HFRS
汉坦病毒(HTNV)	黑线姬鼠	亚洲	HFRS
萨列马岛病毒(SAAV)	黑线姬鼠	东欧	HFRS
桑加索病毒(SANGV)	林柔毛鼠属(非洲木鼠)	几内亚	HFRS
汉城病毒(SEOV)	褐家鼠(褐鼠)及黑家鼠(黑鼠)	亚洲,世界各地	HFRS
主要与仓鼠科家族 田鼠亚科相关			
普马拉病毒(PUUV)	河堤田鼠(堤岸田鼠)	欧洲	HFRS
图拉病毒(Tula virus)	普通田鼠	欧洲	HFRS

*本章包含Charles F. Fulhorst和Michael D. Bowen在本手册第11版第96章中呈现的部分内容

（续　表）

病毒种[a]	自然啮齿动物宿主(s)	已知的地理分布	人类疾病
主要与仓鼠科家族林鼠亚科，或棉鼠亚科相关的			
安第斯病毒（ANDV）	小啸鼠属长尾鼠（长尾稻田大鼠）	南美	HPS
河口病毒（Bayou virus）	稻鼠（沼泽稻鼠）	美国	HPS
黑渠港病毒（Black Creek Canal virus）	刚毛棉花鼠（硬毛棉花大鼠）	美国	HPS
Choclo 病毒（Choclo virus）	小啸鼠属短尾鼠（北方侏儒水稻鼠）	巴拿马	HPS
拉古纳内格拉病毒（Laguna Negra virus）	暮鼠属（小暮鼠及大暮鼠）	阿根廷，玻利维亚，巴西，巴拉圭	HPS
辛诺柏病毒（SNV）	鹿鼠及白足鼠	美国，加拿大	HPS
主要与劳亚食虫目鼩鼱科相关的			
Uluguru virus	坦桑鼠鼩鼱属（坦桑鼠鼩鼱）	坦桑尼亚	HFRS

注：[a] 鼠亚科，旧世界大鼠和小鼠；田鼠亚科，田鼠和旅鼠；林鼠亚科和棉鼠亚科，新世界大鼠和小鼠；鼩鼱目，鼩鼱

汉坦病毒最初是从啮齿目动物（如小鼠、大鼠和田鼠）中分离出来的，其他的自然宿主还包括鼩鼱目动物（如地鼠和鼹鼠）和翼手目动物（如蝙蝠）[13]（表 98-1）。随着分子技术的应用，发现汉坦病毒在许多新的动物宿主中存在，目前已经扩大了可能是汉坦病毒宿主的哺乳动物的名单[14]。然而任何特定的汉坦病毒种类几乎只限于单一的哺乳动物宿主，因此，其相关疾病的地理分布仅限于其宿主的范围和分布。此外，人类感染汉坦病毒后疾病的严重程度受到病毒的种类和株系的影响，从非感染状态到报道的病死率 50％不等[14]。

旧世界汉坦病毒（Old World hantavirus species）在亚洲和欧洲均有发现，其中汉坦病毒（haantan virus）为其原型种，旧世界汉坦病毒的致病种已知可引起 HFRS，而新世界汉坦病毒（New World hantavirus species）的致病种则会引起 HPS。目前非洲汉坦病毒尚未发现与人类的疾病综合征有关系，大多数已确认的非洲汉坦病毒在遗传学上比旧世界或新世界的汉坦病毒更加多样化，在某种程度上导致了它们不能及时被发现，需要开发新的诊断方法来捕获和发现潜在的对人类致病的汉坦病毒种。

二、病原体描述

汉坦病毒病毒颗粒呈球形至卵圆形，直径在 80～120 nm，具有脂质双层包膜[15]。外壳显示出似网格状的形态，将它们与其他布尼亚病毒目区分开来[16]（图 98-1）。从病毒粒子的包膜向外突出的刺突长约 6 nm，由糖蛋白 G1 和 G2（以前分别称为 Gn 和 Gc）组成。病毒粒子内部含有核糖核酸——单链基因组 RNA 的片段与核糖核酸蛋白和 RNA 聚合酶的复合物。汉坦病毒的核衣壳是一种多功能蛋白，与 RNA、多种病毒和细胞蛋白相互作用，参与基因组包装、RNA 分子伴侣、细胞内蛋白质转运、DNA 降解、干预宿主翻译、限制宿主免疫反应等[17]。

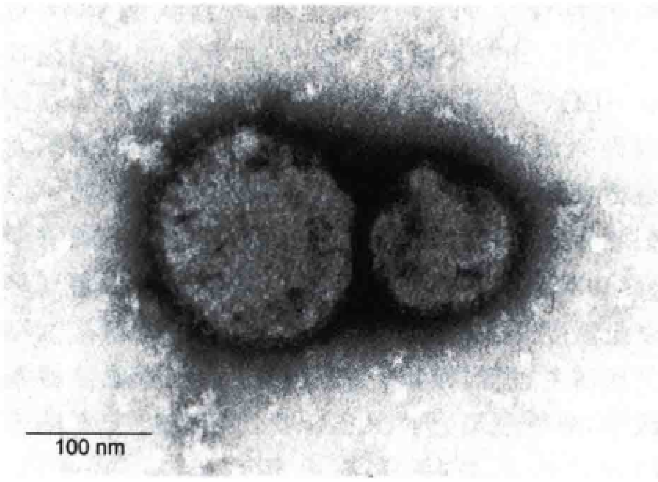


图 98-1　辛诺柏病毒负染电子显微镜照片（2% 磷钨酸染色，pH 6.5）。承蒙美国疾病预防控制中心 Charles Humphrey 允许

汉坦病毒基因组的结构组成与布尼亚病毒目一样典型，每个病毒粒子由小（S）、中（M）和大（L）3 个单股负链 RNA 片段组成[15]。S 片段（为 1.7～2.1 kb）编码汉坦病毒核衣壳蛋白，某些汉

坦病毒种存在可读框重叠于核蛋白并编码非结构蛋白。M片段(3.6～3.7 kb)编码糖蛋白前体,共翻译裂解产生包膜糖蛋白G1和G2。L片段(6.5～6.6 kb)编码RNA依赖的RNA聚合酶,是3个基因组片段中最保守的片段[3]。与其他布尼亚病毒目一致,核糖核衣壳具有螺旋对称性,由于高度保守碱基配对的结果形成环状结构,在每个基因组末端具有高度保守的反向互补核苷酸序列[18]。

三、流行病学和传播

旧世界汉坦病毒被认为是那些主要在亚洲和欧洲发现的病毒种。全球每年报告汉坦病毒感染病例15万～20万例,出血热伴肾病综合征病例3万例,其中中国占的比例最大[19-20]。亚洲最常见的2种汉坦病毒是汉坦病毒(Hantaan virus,HTNV)和汉城病毒(Seoul virus,SEOV)。在南韩、中国和俄罗斯东部,HTNV的自然宿主为黑线姬鼠(条纹野鼠),并导致中重度HFRS。最近一项来自中国的现场及流行病学数据分析(1960－2013年)显示当气候变化有利于啮齿类动物的繁殖和病毒传播时,汉坦病毒感染更容易发生[21]。SEOV的宿主主要是褐家鼠(褐鼠),该病毒可导致中等程度的HFRS,据报道其病死率高达15%[22]。由于褐鼠的广泛分布,在全球范围内均有SEOV感染发生[23]。2012年英国发现24例[24],2013年瑞典发现25例[25],2017年美国发现26例由宠物鼠引起的人感染SEOV事件[26]。

多不拉伐-贝尔格莱德病毒(Dobrava-Belgrade virus,DOBV)在欧洲中东部地区引起了轻度至重度HFRS[22]。目前已知DOBV存在3种自然宿主:黑线姬鼠、黄斑姬鼠(黄喉野鼠)、桥姬鼠(黑海野鼠)。与DOBV密切相关但又不同于DOBV的是萨列马岛病毒(Saaremaa virus,SAAV),SAAV的自然宿主与DOBV相同均为黄喉野鼠和条纹野鼠[27]。普马拉病毒(Puumala virus,PUUV)的自然宿主为河堤田鼠(堤岸田鼠),PUUV在欧洲和俄罗斯西部引起一种相对温和的HFRS——流行性肾病。

1993年在美国的四州交界地区(新墨西哥州、犹他州、亚利桑那州和科罗拉多州)暴发了一场由鹿鼠传播的辛诺柏病毒(Sin Nombre virus,SNV)感染,此时汉坦病毒感染在美国才被发现[6]。新世界汉坦病毒的地理分布从加拿大经过美国和拉丁美洲到南美洲。虽然新世界汉坦病毒感染对汉坦病毒致病的总负担低于旧世界汉坦病毒,但在小啸鼠属长尾鼠(长尾稻田大鼠)中发现的SNV和安第斯病毒(Andes virus,ANDV)可引起严重的汉坦病毒感染,是造成北美洲和南美洲HPS的主要原因。1993－2015年,美国疾病预防控制中心报告了662例HPS病例[230例死亡(35%)],其中大部分病例是由SNV感染引起的[28]。2009－2014年在阿根廷首都布宜诺斯艾利斯发现的1386例汉坦病毒感染疑似病例中,88例被确诊为HPS,其中大多数病例归因于ANDV感染[29]。虽然每年确证的HPS病例远少于HFRS病例,但HPS的感染通常具有高度致死性,病死率为20%～60%。

自2006年以来,越来越多的汉坦病毒毒株在非洲被陆续成功分离鉴定[11]。桑加索病毒(Sangasou virus,SANGV)在林柔毛鼠属(非洲木鼠)体内被检测到[30],这是非洲首次鉴定出的汉坦病毒种[31]。利用基于L片段高度保守位点的逆转录-聚合酶链反应(reverse transcription PCR,RT-PCR)检测分析,在西非和东非地区发现了桑加索病毒和其他类型非洲汉坦病毒[11-12,30]。针对非洲汉坦病毒研发的新型血清学试验技术已被用于对潜在的动物宿主和感染人群进行血清学筛查[12,32]。越来越多的证据表明,非洲汉坦病毒在人类中引起类似于HFRS的疾病[12]。

人类感染汉坦病毒最常见的传播途径是吸入被感染啮齿动物的尿、唾液或呼吸道分泌物的飞沫,或者是吸入了被感染者或储存宿主的分泌物或排泄物污染的粪便、尘埃或其他有机物的雾化颗粒[33]。其他感染途径如通过啮齿动物或其他储存宿主的叮咬引起的传播是十分罕见的,而且人际传播也只有在ANDV感染的急性阶段被证实存在过[7]。

人类感染的风险取决于人类暴露于被感染啮齿动物及其分泌物或排泄物的频率和强度。近距离清扫感染啮齿动物的住所增加了感染的风险[34-37]。鉴于现代旅行的相对便利性及从症状出现到确诊的时间间隔较长,在HPS暴发调查期间准确及时识别和定位可能暴露于被感染啮齿动物的人群方面仍然存在流行病学上的挑战[38]。

四、临床意义

危重型 HFRS 和 HPS 的临床和病理学特征表现为急性血小板减少征及微血管(毛细血管)通透性可逆性增加。这两种综合征的主要区别在于腹膜后腔是 HFRS 血管破坏的主要部位,而肺部和胸腔是 HPS 血管破坏的主要部位。

HFRS 和 HPS 的潜伏期通常 2～4 周,但也可以从几天到 2 个月。HFRS 临床过程分为 5 个时期:前驱期(典型的表现 3～7 天)、低血压期(数小时到 4 天)、少尿期(4～5 天)、多尿期(7～11 天)和恢复期(数周～数月)。同样,HPS 的临床过程可以分为 4 个时期:前驱期(3～6 天)、心肺期(7～10 天)、多尿期(1～3 天)和恢复期(数周～数月)。HFRS 的死亡通常是由于低血压期或多尿期的休克引起。HPS 的死亡通常是由于缺氧(肺水肿)或心肺期休克导致。

由 HTNV 或 DOBV 引起的严重 HFRS,前驱症状多起始于突然发作的高热、寒战、头痛、视物模糊、萎靡和厌食,此外包括严重的腹部和腰部疼痛,胃肠道症状、面红、瘀点、红斑疹或结膜出血。低血压期开始于特征性的血小板数量减少,随后退热及突发低血压,可能会向休克和更明显的出血症状发展。其他异常包括血清中天冬氨酸转氨酶的水平升高[39]。在少尿期,血压恢复正常或变高,尿排出量急剧下降,血清肌酐的浓度和血液尿素氮增加,严重的出血可能会发生。自发多尿,每天尿量高于 3 L 预示着恢复。明显的临床分期较少见于汉城病毒和流行性肾炎引起的 HFRS[40]。流行性肾炎通常不会出现可见的浅表出血,病理检查发现在 HFRS 尸解标本中有体腔渗出物、腹膜后腔水肿和增大、阻塞及肾出血[41]。

1993 年,HPS 作为一种高死亡率的疾病在美国西南部被首次报道[6]。原先关于 HPS 的描述后来被修订过[42],包括了轻微的感染,这些感染导致影像学上无明显改变的肺部疾病[43]。现在认识到至少是在美国的南部,HPS 有时有肾脏的损害和出血症状[44-46]。HPS 的前驱症状以发热、肌痛和不适为特征。其他可能发生的前驱症状可能包括头痛、头昏、厌食、腹痛、恶心、呕吐和腹泻。干咳和呼吸急促通常标志着肺水肿的开始。HPS 的全程发展以快速的(时间范围 4～24 h)非心源性的肺水肿、血氧不足、大量的胸膜积液和心源性休克为特征。低血压和少尿是休克的结果。心肌抑制可能出现并导致休克的发生[47]。利尿期的特点是快速消除肺水肿、发热和休克的恢复。HPS 住院患者血液异常包括血小板减少、血细胞比容升高、血液浓缩、白细胞增多及出现大的反应性淋巴细胞(免疫母细胞)[48-49]。其他实验室检查异常情况可能包括肝酶水平的升高、低蛋白血症和代谢性酸中毒。在严重病例,还会有乳酸性酸中毒。HPS 致死性病例尸解检查大的异常发现包括支气管和其他气道中大量的泡沫状液体、重度水肿肺及大量的胸腔积液[49-50]。

(一)治疗

HFRS 和 HPS 的治疗首先要从解决患者入院后的临床症状开始。HFRS 的休克通常可通过及时给予血管升压药物和静脉输液得到有效的控制。当患者出现急性肾衰竭时,可以进行血液透析来控制症状[51]。HPS 患者可以迅速发展为呼吸衰竭或心源性休克,因此应该较早通过机械通气和(或)体外膜肺氧合技术给氧[52]。在中国和韩国进行的研究中发现,发病后早期给予利巴韦林对 HFRS 患者的治疗有很大帮助[53-54],但是利巴韦林在 2 例美国临床试验中并没有明显改善 HPS 患者的治疗效果[55-56]。

(二)动物模型

目前,啮齿动物、鼩鼱、田鼠和蝙蝠已被确认为汉坦病毒的自然宿主[11],这些小型哺乳动物感染后不出现症状,但可以通过其排泄物水平传播汉坦病毒[57]。这些动物不能再现人类的疾病,所以它们不是可行的汉坦病毒的研究模型。此外,迄今为止尚无汉坦病毒垂直传播的证据[58-59]。感染汉坦病毒的新生小鼠出现神经系统疾病并死亡[60-61],但这种疾病并不能模仿人类 HFRS,因此不存在由旧世界汉坦病毒引起的 HFRS 啮齿动物模型。使用食蟹猴作为研究 PUUV 疾病模型的成功报道有限,这些动物感染时的 HFRS 症状较人类感染为轻[62-63]。

在新世界汉坦病毒中,ANDV 已经被证实能够引起叙利亚金仓鼠出现类似于 HPS 病程的致死性疾病[64-66]。马普拉(Maporal)和拉古纳内格拉(Laguna Negra)病毒在仓鼠中可以诱发死亡和

HPS样疾病[67-68]。最近的一项研究表明，恒河猴接受来自SNV感染的鹿鼠的肺匀浆后，发生了类似人类HPS的临床疾病[69]。

(三)抗病毒药物

目前，美国FDA还没有批准任何用于预防或治疗HFRS或HPS的抗病毒药物。除利巴韦林之外，法维匹拉韦(favipiravir，T-705；6-氟-3-羟基-2-吡嗪甲酰胺)是一种已报道的能够抑制马普拉病毒、DOBV和ANDV的核苷类似物[70-72]。另一种核苷类似物ETAR(1-β-D-呋喃核糖基-3-乙炔基-[1,2,4]三唑)也可抑制新生小鼠汉坦病毒感染[73]。

汉坦病毒核蛋白(N)在病毒基因组包装、病毒RNA合成和翻译中起着重要作用。Salim和同事们已经证明，多种化学抑制剂中断了ANDV核蛋白和病毒RNA之间的相互作用，阻止了病毒RNA的合成和翻译，并抑制了细胞培养中ANDV的复制[74]。另一种以病毒为靶点的抗病毒药物——乳铁蛋白，可以结合病毒糖蛋白(G)从而抑制病毒对细胞的吸附，并提高了被感染新生小鼠的存活率[75-76]。此外，汉坦病毒G2包膜蛋白是一类Ⅱ型融合蛋白，是G蛋白复合物的一部分[77-78]。当被触发时，它会在酸性条件下将病毒膜与包涵体膜融合[79-80]。研究表明，汉坦病毒膜融合和进入细胞受到ANDV G2糖蛋白跨膜结构域Ⅲ和茎段的蛋白质片段的抑制，发现在Vero-E6细胞中这些片段阻断了高达60%的ANDV感染[81]。

在啮齿类动物上进行的几项研究表明，被动转移针对HTNV或ANDV的中和抗体可以保护动物免受同一病毒的攻击[82-84]。此外，将来自PUUV免疫患者的抗体(Fab)轻链分子克隆转化到噬菌体展示文库中，筛选出的Fab片段用于检测细胞培养中病毒G蛋白的结合活性和对PUUV的中和活性[85]。13个Fab克隆中有4个显示能够使PUUV病灶数目减少44%～54%[85]。另一项研究发现，用编码ANDV G蛋白的DNA疫苗处理过的鹅产生的抗体可以有效地保护被ANDV感染5天后的仓鼠[86]。由于缺乏哺乳动物*Fc*基因，鹅源Fab片段和*IgY*基因并没有产生不必要的免疫反应，因此这些抗体具有潜在的疫苗开发潜力。

RNA干扰是在真核细胞中观察到的一种转录后的、序列特异的RNA降解过程，是一种对抗病毒感染的防御机制[87]。针对每个*ANDV*基因组片段(S、M和L)的小干扰RNA(siRNA)池已经被用来测试在Vero-E6和人类原代肺内皮细胞(human primary lung endothelial cells，HMVEC-L)中减少病毒复制的效果，HMVEC-L是人类ANDV感染的主要靶点[88]。有趣的是，针对S片段的siRNA池比针对L或M片段的siRNA池能更有效地抑制Vero-E6细胞中ANDV的复制。与此相反，靶向M片段的siRNA池降低了HMVEC-L细胞中的ANDV滴度[88]。此外，在最近的一项研究中发现一种针对HTNV G蛋白(scFv)的单链抗体能与鱼精蛋白中的阳离子肽融合，随后与M片段的siRNA复合。该嵌合蛋白可以识别感染细胞中HTNV G蛋白[61]。结合的融合蛋白内化后将siRNA载体输送到受感染细胞的胞浆中[89]。结果表明，siRNA复合物不仅可以抑制Vero-E6细胞中HTNV的复制，而且可以作用于被感染新生小鼠的脑细胞，有效地保护它们免于死亡[61]。

除了直接靶向汉坦病毒的抗病毒药物外，靶向宿主蛋白的抗病毒药物也被陆续研发。致病性汉坦病毒进入宿主细胞是通过β3整合素介导的[90-91]。Hall和他的团队使用多种环肽阻断SNV和ANDV与β3整合素受体的结合，使这些病毒的体外复制减少了50%[92-94]。此外，汉坦病毒感染过程还涉及其他受体和细胞进入途径[95-97]。联合使用多种抗病毒药物是有效治疗汉坦病毒感染的必要手段。

汉坦病毒感染引起毛细血管通透性增加和血管渗漏。内皮细胞的感染激活了激肽-激肽释放酶系统并释放缓激肽[98]。缓激肽与缓激肽B2受体的结合触发炎症反应，导致血管扩张和血压降低。艾替班特(icatibant)是缓激肽B2受体的肽类拮抗剂，能阻断缓激肽与其受体的结合并阻止随后的炎症反应。泰勒等已经证明，艾替班特能阻断人类脐静脉内皮单层细胞感染ANDV或HTNV后的开放[98]。此外，另一研究发现1例感染PUUV的患者在经过艾替班特治疗后痊愈[99]。

(四)疫苗

美国FDA目前还没有批准任何预防汉坦病毒感染的疫苗。以甲醛或β-丙酸内酯灭活病

毒为基础的疫苗已在韩国和中国研制并用于人类 HFRS 的防治[100-101]。这些疫苗是基于从感染了 HTNV 或 SEOV 的乳鼠大脑或细胞培养物中获得的病毒颗粒研制的。自 1995 年以来，基于 HTNV 和(或)SEOV 的疫苗已在中国高流行区使用[101]。韩国的 Hantavax 疫苗按照 3 次接种程序进行测试。接种者在最后一次接种疫苗后体内可产生足量的针对 HTNV 的中和抗体并且保护性免疫能够持续 2 年[102]。俄罗斯将 PUUV 灭活疫苗和 DOBV 灭活疫苗结合在一起研发了一种新型二价疫苗。这种疫苗与氢氧化铝佐剂结合，在 BALB/c 小鼠中能够诱导产生同时针对 PUUV 和 DOBV 的中和抗体[103]。

嵌合病毒是由非复制型腺病毒载体制成的。表达 ANDV 的 N、G1 或 G2 蛋白的腺病毒能够保护仓鼠免受 ANDV 的攻击[104]。另一种使用表达 SEOV G1 或 G2 蛋白的复制型犬腺病毒的方法也被证明能够在小鼠体内诱导产生抗 SEOV 感染的中和抗体[105-106]。

含有病毒核心颗粒的病毒样颗粒(virus-like particles，VLPs)通常被用作容纳自身或外来病毒蛋白的平台。Li 和他的同事们在中国仓鼠卵巢细胞中制备了能共表达 HTNV N，G1 和 G2 蛋白的病毒样颗粒。比较了用病毒样颗粒和中国二价灭活疫苗(基于 HTNV 和 SEOV)两种疫苗接种小鼠后的免疫应答反应[107]。结果显示，病毒样颗粒疫苗接种诱导的针对 N 蛋白的细胞免疫应答水平要高于灭活疫苗[107]。此外，ANDV 或 PUUV 的 G1 和 G2 蛋白已被证明能自组装成病毒样颗粒，并能与患者血清发生反应[108]。

DNA 疫苗与上述疫苗相比更容易构建，并具有诱导长期体液和细胞免疫应答的优点。含有 *M* 或 *S* 基因(编码 G 或 N 蛋白)的 DNA 疫苗已经通过使用 HTNV、SEOV、PUUV、ANDV 和 SNV 的基因序列制成。接种这些疫苗的各种模型动物随后被动感染相应种属的汉坦病毒。总的来说，非人灵长类动物和兔子的免疫反应和免疫保护比仓鼠更好，G 蛋白构建物诱导的免疫反应比 N 蛋白构建物更强[64,84,109-111]。最后，受试者接受基因枪介导的编码 HTNV 或 PUUV G 蛋白的 DNA 疫苗，开发针对相应病毒的中和抗体。接种 HTNV 和 PUUV DNA 疫苗的大多数受试者(7/9)都产生了抵抗 PUUV 的中和抗体，其中对 PUUV 疫苗反应最强的 3 个受试者对 HTNV 也有强烈的中和抗体反应[112]。

五、标本的采集、运输和储存

因为关于潜在致病标本的运输规则可能会改变，在运送临床样本到诊断实验室前，临床医生应与地方卫生部门和有能力诊断汉坦病毒的国家(或国际)参考实验室按现行指导方案协商。

从临床急性期患者的血液、血清、尿和脑脊液中已分离出具有感染性的汉坦病毒[33]，因此，这些和其他生物材料被认为对人类具有潜在的感染性。美国卫生和人类服务部建议对处理汉坦病毒临床样本采取以下预防措施：①来自可能 HFRS 或 HPS 病例的血清应在 BSL-2 处理；②可能的感染性组织样本应在 BSL-2 处理，按照 BSL-3 要求操作；③所有可以导致人体体液溅洒或气溶胶产生的操作应在经认证的生物安全柜内进行；④细胞培养病毒传代和纯化应按照 BSL-3 要求操作，在 BSL-3 实验室进行[113]。由于汉坦病毒不耐热[114]可以被破坏脂质膜的试剂灭活，这些试剂包括许多商业产品，及酸、醇、次氯酸钠、多聚甲醛和紫外线[115-117]。以前曾报道过实验室获得性感染[118-119]，尽管人们对汉坦病毒在液体、气溶胶或干燥状态下的存活情况还不是很了解，但据报道感染性病毒在干细胞培养基和低温液体中能存活 2 天或更长时间[33]。

如前报道[37]，血清学使用的血液、血清和血浆样本可以在 4℃ 保存，如果样本收集和检测之间间隔不长可以冷藏包装条件下运至诊断实验室。否则，这些样本应保藏在 −20℃ 或干冰冷冻运输。任何用于 RNA 提取和(或)病毒分离的生物样本(例如血液、血凝块和固体组织)，应在低于 −70℃ 保存(避免反复冻融)、干冰运输，以保护病毒 RNA 的完整性和病毒的感染性。通过航空运输标本，应该将标本包装、记录，按照国际航空运输协会危险物品条例进行(https://www.iata.org/pages/default.aspx)。在美国，陆路运输货物必需遵照美国运输部的条例进行(49 CFR parts 171～178)。

六、直接检查

正如以前报道的，用于人类汉坦病毒感染诊

断的实验室检测方法还没有被标准化[37]，尚无汉坦病毒诊断方法得到美国 FDA 的批准。欧洲生产的商品化的现有诊断试剂盒销售到美国仅限于研究使用。

(一)显微镜检查

HPS 的组织病理学改变主要表现为肺泡内大量水肿和肺内毛细血管炎(图 98-2)。脾内可以观察到显著的免疫母细胞(图 98-3)。但是这些组织病理学改变并不具有特异性，需要进一步的辅助检测，如免疫组化或分子检测以确认诊断。组织的直接电子显微镜检查的诊断价值有限，但过去常用于尸解标本中病毒粒子和病毒复制结构的检测。电子显微镜检查 HFRS 和 HPS 患者尸解组织，发现成熟的病毒颗粒很少，难以鉴定的主要原因是由于病毒大小和形态上的变异很大。在完整的病毒颗粒中常常见到判定为汉坦病毒包涵体的结构[50,120]。

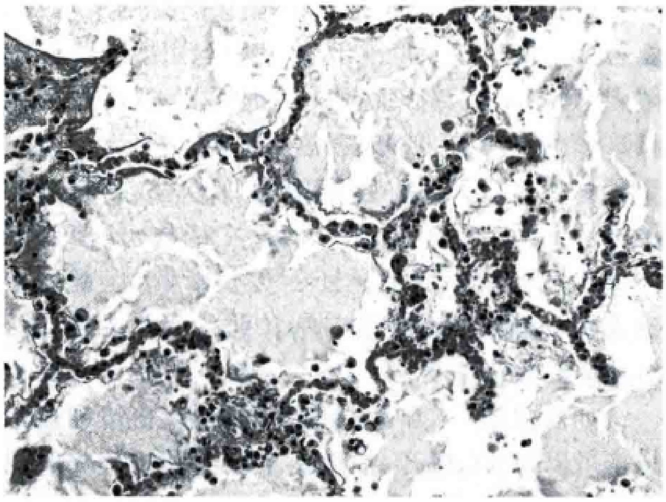


图 98-2 1 例死亡 HPS 患者的肺组织显微镜检显示肺泡内大量水肿和肺微血管(毛细血管炎)炎症，见彩插

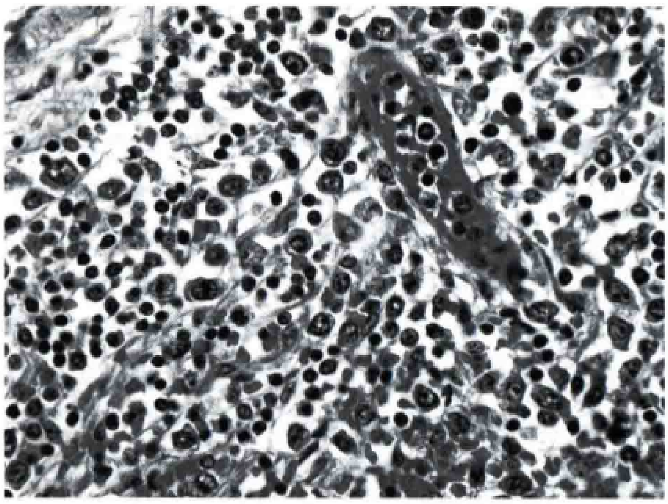


图 98-3 1 例死亡 HPS 患者的脾脏组织显微镜检显示存在显著的免疫母细胞，见彩插

(二)抗原检测

免疫组织化学常常用于检测 HFRS 死亡病例、流行性肾炎的活检组织和 HPS 死亡病例组织中的汉坦病毒抗原检测(图 98-4)[50]。多克隆抗体(例如，免疫血清，来源于人、实验感染的兔，实验或自然感染的啮齿动物)和鼠单克隆抗体在免疫组织化学实验中用作一抗。致死性的 HPS 与肺脏、脾脏、肾脏和心脏组织中广泛分布的汉坦病毒抗原有关，这些抗原定位在毛细血管内皮细胞和其它小血管中[50]。免疫组织化学实验用于人类汉坦病毒感染诊断的局限性在于只有少数的机构可使用合适的一抗和对照组织。

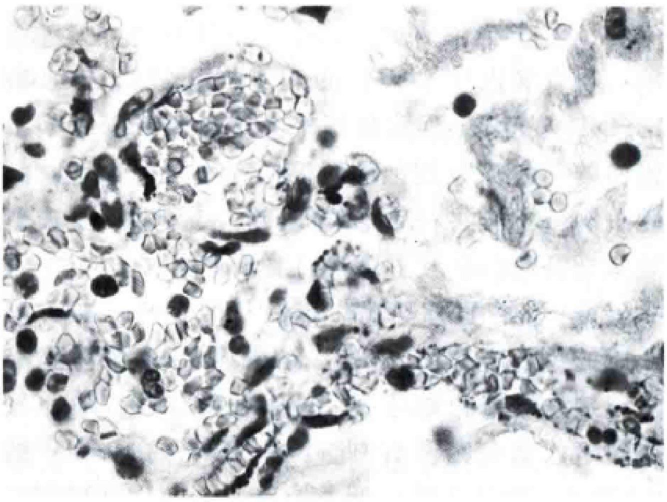


图 98-4 1 例死亡 HPS 患者的肺组织显微镜检显示汉坦病毒抗原存在于肺毛细血管中，通过免疫组织化学染色法将汉坦病毒抗原染为红色，见彩插

七、鉴定

(一)核酸检测

RT-PCR 是一种广泛应用的汉坦病毒分子诊断方法。疾病预防控制中心(CDC)收集了一些如血清、全血、支气管肺泡灌洗液和来自疑似病例(偶尔也包括啮齿动物)的器官碎片的样本，用于汉坦病毒的检测[26,121]。除了通过检测病毒 RNA 来确认汉坦病毒感染外，还可以对产生的 PCR 产

物进行测序，通过系统进化树来分析鉴定病毒。应用RT-PCR技术可以在症状出现后的3～10天从人体标本中检测到汉坦病毒RNA。汉坦病毒种流行的地理位置信息有助于使用针对该种汉坦病毒特异性的S和M片段引物[8,122]。但是多种汉坦病毒类型在一个地区同时流行，会使这种鉴定复杂化。例如，新世界汉坦病毒和旧世界汉坦病毒SEOV都存在于美国的野生啮齿动物种群中[23,123～124]。为了检测这些样本中目前已知的汉坦病毒，设计了一套针对汉坦病毒高度保守的L片段的四联引物，并在疾病预防控制中心建立了巢式RT-PCR检测方案[23]。一种类似的靶向L片段的巢式RT-PCR检测方法在非洲木鼠样本中发现了一种新型的汉坦病毒[30]。此外，研究人员使用针对HTNV/SEOV或PUUV/希望山病毒M片段保守区域的引物进行巢式RT-PCR，并对其产物进行测序鉴定了现在已确认的SNV[6,125]。

实时RT-PCR是另一种诊断汉坦病毒感染的敏感方法。该方法的优点是能够量化样本中的病毒载量，且由于扩增循环较少可以缩短检测时间[126～127]。然而，由于汉坦病毒的高度序列多样性阻碍了有效的泛汉坦病毒实时定量RT-PCR引物和探针的设计。因此，实时RT-PCR的应用仅限于检测某地区遗传基因密切相关的汉坦病毒的流行，以及对1例已知汉坦病毒感染病例接触者的随访[26,121,127～128]。

RT-PCR检测技术只有当患者处于感染的急性期且病毒血症仍存在时才能检测到病毒RNA的存在。通常患者住院时PCR方法已无法检测到病毒RNA的存在。PCR应被作为一种补充检测方法，与血清学试验相结合如IgM/IgG酶联免疫吸附试验(enzyme linked immunosorbent assay，ELISA)，创建一个完整的诊断组合以确诊或排除汉坦病毒感染。

(二)血清学试验

诊断汉坦病毒感染通常从患者的临床和流行病学资料开始，如发热、肌痛、低血小板计数、肾衰竭或呼吸窘迫，以及患者最近是否接触过啮齿动物的排泄物。在收到疑似病例的样本后，才进行实验室检测。除核酸检测方法如RT-PCR(上文所述)外，几种血清学试验方法也被用于汉坦病毒的诊断。

免疫荧光分析(immunofluorescence assay，IFA)被认为是诊断汉坦病毒感染的最早的血清学试验方法之一[129]。IFA利用汉坦病毒感染的细胞作为抗原固定在玻璃板上，稀释后的血清样本被加入到玻璃板上以检测病毒抗原。然而，抗原制备时汉坦病毒病毒含量过低及非特异性抗体结合导致的高背景信号可能影响IFA结果的质量和解释。多参数IFAs已被开发并且在欧洲实现商业化。将被HTNV-、PUUV-、SEOV-、SAAV-、DOBV-、SNV-和ANDV-感染的细胞包被在生物芯片上的基质上，与血清样品发生反应。一份报告表明，这种多参数化的IFAs可以与许多实验室开发的IFAs和ELISAs相媲美[130]。

检测汉坦病毒最常用的血清学试验是ELISAs。一般而言在出现临床症状后，HFPS和HPS患者的血清中可出现有意义的汉坦病毒特异性IgM抗体[125,131]。随着疾病进展到急性期，可检测到针对汉坦病毒的特异性IgG抗体[132-133]。在HFPS患者中，抗汉坦病毒IgM抗体可在急性期结束后持续6个月，部分患者可在10年后检测到抗汉坦病毒IgG抗体[133-134]。相反，HPS患者体内的IgM抗体水平在感染后2～3个月开始下降，而IgG水平可以维持3年[132,135]。

为了检测汉坦病毒特异性IgM抗体，美国疾病预防控制中心、州立公共卫生实验室和一些商业参考实验室开发出一种IgM捕获ELISA法[125]。该方法使用样本中的山羊抗-μ捕获的IgM结合感染细胞裂解物中的病毒抗原，而不是像商业上常用的间接IgM方法那样将病毒抗原固定在固体底物上[136-137]。这种方法与间接法相比结果更加准确，较少出现假阳性结果[138]。但是IgM捕获ELISA法的操作过程需要超过4 h，比间接ELISA法所需操作时间要长。

样品中IgG滴度的检测方法与IgM不同，是用间接ELISA法进行测定。一项关于B细胞成熟过程的研究表明IgG识别的大多数表位是连续的、特异的，比IgM识别的表位丰度要少[139]。因此，被包被的病毒抗原表面的短的线性肽代表了IgG所识别的优势表位。如果有BSL3实验室，汉坦病毒感染的Vero-E6细胞的裂解物可作为病毒抗原的来源[125]。另外，重组N蛋白已经被用作IgM和IgG ELISAs的抗原[137-138,140-141]。然而，在解释基于针对单一蛋白表位的抗体的数据时必须

谨慎，会增加出现假阴性结果的可能性。

值得注意的是ELISA中特异性的汉坦病毒抗原可以检测其他类型的汉坦病毒。系统进化分析显示SNV是新世界汉坦病毒的原型[142]，SNV抗原可用于检测所有已知的新世界汉坦病毒的IgM或IgG[143-145]。PUUV患者血清IgG可与HTNV、SEOV、DOBV或SNV的重组N蛋白发生交叉反应[146]。

免疫印迹法是另一种用于汉坦病毒检测的血清学试验，在欧洲已经获得了商业应用[137,147]。在市售的检测方法中，硝化纤维素试纸上涂有电泳分离的PUUV和HTNV的全长N蛋白或PUUV、HTNV、SEOV、DOBV和SNV的重组N蛋白的N端。该试纸条还含有用于同型分化的控制带(IgG或IgM)。这些免疫印迹法已被证明对急性期HPS患者IgG检测具有高度敏感性，而对IgM检测只有76%的特异性[137]。

到目前为止，在所有描述的血清学试验当中，只有中和试验才能确定是哪种汉坦病毒血清型所引起的感染。通过计数覆盖有琼脂糖或甲基纤维素的Vero-E6细胞单层中的病毒噬斑或感染灶的数量来测量病毒感染力的中和(或减弱)。采用空斑减少中和试验(focus reduction neutralization test，FRNT)，通过比较血清样本与相关汉坦病毒的中和滴度，来鉴定汉坦病毒血清型[148-149]。被检测的汉坦病毒之间，如果中和抗体的滴度有4倍差异即可作为确定汉坦病毒血清型的标准[148]。然而，FRNT需要在BSL3实验室培养细胞，这一条件并非所有实验室都具备。而且该方法费时费力。总之，如果不能采用新一代测序技术(NGS)(一种昂贵的替代方法)进行检测时，FRNT可以用于确定特定的汉坦病毒感染。

(三)分离病毒

从自然宿主中分离出汉坦病毒难度大，却是分析这些病毒生物学特性所必需的，最常见的方法是用感染者或动物的血液、血清、尿或组织匀浆样品接种培养细胞。Vero-E6细胞因其产生干扰素的遗传缺陷，成为分离病毒的首选细胞系，接种后约2周，可以用免疫荧光法检测感染细胞中的汉坦病毒[150-153]。需要反复传代接种细胞才能成功地分离出病毒[150]。然而，在细胞培养中传代的汉坦病毒通常会因为适应细胞生长而改变它们的特性。研究表明，与从野生田鼠(病毒的自然宿主)中分离的野生型病毒相比，从Vero-E6细胞分离的PUUV在S和L片段均发生了突变，而且细胞培养分离物不能再感染野生田鼠[154-155]。此外，一些汉坦病毒已被证明能够比其他病毒更有效地感染培养细胞[156]。

研究表明汉坦病毒可以成功地从实验室动物中分离出来。选择实验动物通常是基于它的遗传背景与那些自然病毒宿主的关系[157-158]。然而，PUUV是从仓鼠中分离出的，仓鼠与堤岸田鼠只有远亲关系[159]。其他因素，如动物的年龄和接种的途径，也会对从实验室动物中是否能成功分离出病毒产生影响[158]。

八、结果的评价、解释和报告

目前对于汉坦病毒感染还没有特异性的治疗方法，对HFPS和HPS的早期诊断是成功治疗的关键。然而，早期诊断有一定的难度，因为汉坦病毒感染的前驱期症状是非特异性的，血小板减少是这个时期唯一的异常和重要的实验室发现[160]。如果汉坦病毒疾病流行地区的医务人员发现患有血小板减少综合征的患者伴有发热、心动过速和呼吸急促等其他症状，则应当警惕汉坦病毒感染。正如前文所述ANDV可以在人与人之间传播，因此快速诊断的重要性不仅增加了成功治疗患者的可能性，而且有利于实施适当的隔离方案以防止病毒传播给医务人员，并限制其可能传播给与患者有密切接触的其他人[161]。

由美国疾病预防控制中心建立的汉坦病毒肺综合征(及出血热伴肾病综合征)的实验室诊断标准如下(见 http://www.cdc.gov/hantavirus/health-care-workers/hps-casedefinition.html)。

· 符合HPS病例定义的人体内存在汉坦病毒特异性IgM(http://www.cdc.gov/hantavirus/health-care-workers/hps-case-definition.html)或急性期和恢复期双份血清中汉坦病毒IgG滴度有四倍或以上增高

· 血浆或其他类型的生物样本中RT-PCR检测汉坦病毒特异性RNA阳性

· 肺、脾、肾或其他组织中汉坦病毒抗原免疫组化分析阳性

汉坦病毒诊断的金标准是血清学方法，可以

在大多数患者的前驱症状期检测到IgM和IgG抗体[14,162-163]。另外，IgM捕获ELISA和IgG ELISA的合适对照（例如，实验室HPS确诊病例的血清），免疫组织化学试验对正确解释这些试验结果是必不可少的。大多数当地实验室不能直接使用这些材料。因此，诊断试验常常限于联邦实验室或对HFRS和HPS有特别兴趣的研究机构和一小部分商业实验室。此外由于缺乏标准化的检测方法，实验室检测的整体质量差异很大。例如，2010年一项涉及欧洲和加拿大18个实验室的汉坦病毒感染血清学诊断的外部质量控制研究显示，仅有53%的IgM和76%的IgG阳性样本被正确诊断[164]。

RT-PCR检测可以提供更多的信息，扩增的汉坦病毒片段序列分析可以用于鉴定引起感染的病毒种类。与血清学试验方法相似，该方法也必须通过已知的阳性对照和阴性对照进行质量控制。

正如Fulhorst和Bowen先前所述[37]，“报告HFRS和HPS的要求在地方性卫生机构之间和国家与国家之间是不同的。在美国，在州一级报告HPS病例是强制执行的，在由疾病预防控制中心管理的国家法定传染病监测系统（the National Notifiable Diseases Surveillance System）中HPS被列为法定传染病，虽然报告不是强制的。”疾病预防控制中心有能力进行诊断和确认性实验室检测（包括μ链捕获ELISA法检测抗汉坦病毒IgM，ELISA法检测抗汉坦病毒IgG，RT-PCR和实时定量RT-PCR法检测汉坦病毒特异性RNA及新一代测序技术）。病毒性特殊病原体分部通常在收到的诊断标本后24～48 h内可完成确认性ELISA和RT-PCR的检测（疾病预防控制中心，邮箱：070，佐治亚州亚特兰大市克利夫顿路1600号，邮编30333；电话：404-639-0114；传真：404-718-2175）。

本节所述的发现和结果均代表作者个人观点，与美国疾病预防控制中心无关。本文中提到的产品名称并不意味着被美国健康和人类服务部认可。

参考文献请扫二维码查阅

第 99 章 沙粒病毒和丝状病毒

JONATHAN S. TOWNER, PIERRE E. ROLLIN, YI-WEI TANG, THOMAS G. KSIAZEK

(崔仑标 译;杨滨、汤一苇 审校)

此章重点介绍 2 类病毒性出血热(viral hemorrhagic fever, VHF)病毒:沙粒病毒科[1]和丝状病毒科[2]。它们当中的一些成员在局部地区引起严重的、通常是致死性的 VHF。这些病毒是非洲和南美洲重要的公共卫生问题,虽然此类病毒不属于北美洲的当地疾病,但可以被旅行者从疫区带回美国。沙粒病毒(Arenaviruses),特别是丝状病毒(Filoviruses)还可引起医务工作者和实验室人员严重的与医疗相关的暴发。然而,最近的暴发一般都发生在那些对感染控制疏忽的场所。美国或欧洲尚未发生输入性拉沙和马尔堡出血热与医疗相关的传播。事实表明,如果能够采取标准的感染控制措施足以能够阻止病毒在医疗场所传播。在西非埃博拉暴发期间,多个感染的医务人员被疏散到美国和欧洲。美国已经更新了病例评估和管理、样本收集、运输和处理的指南(http://www.cdc.gov/vhf/ebola/index.html)。遗憾的是,这些措施在非洲或南美洲的贫困地区不能得到很好的实施(http://www.cdc.gov/vhf/ebola/hcp/international/managing-patient-flow.html)。从新的地区不断检测和分离新的沙粒病毒和丝状病毒对公共卫生仍具有重要意义。对疑似沙粒病毒和丝状病毒感染的患者而言,他们在病毒分离、临床管理及病毒诊断程序上都非常相似,因而本章将这 2 类分类学上完全不同的病毒放在一起讨论。其他一些病毒包括布尼亚病毒科和黄病毒科(第 97 和 98 章)也可引起 VHF[3]。

一、分类及病毒的描述

(一)沙粒病毒科

沙粒病毒科包括 43 个已命名的病毒,该类病毒具有独特的形态学及理化特性。病毒抗原相关性的检测要根据其广泛的抗体结合能力而定:包括补体结合试验、间接免疫荧光抗体(indirect fluorescent-antibody, IFA)试验和酶联免疫吸附试验(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)[1]。根据血清学及病毒进化将沙粒病毒分为两组。一组为淋巴细胞性脉络丛脑膜炎(lymphocytic choriomeningitis, LCM)族,也称旧世界族,包括 LCM 病毒和拉沙病毒,后者还包括一些拉沙样病毒、从莫桑比克和津巴布韦分离的 Mopeia virus 及从中非共和国分离的 Mobala virus 和伊皮病毒。所有这些病毒都是从鼠科啮齿类动物分离的。通过分离培养或分子检测及测序从啮齿类动物或人鉴定了一些其他沙粒病毒,来自啮齿类动物的有 Merino Walk virus[4]、Menekre 和 Gbagroube virus[5]、Kodoko virus[6]、莫罗戈罗病毒[7]、草鼠属和南非小鼠病毒[8]及卢娜病毒[9],来自人的有从人传人的致死性出血热暴发病例鉴定的 Lujo virus[3,10]、Lunk virus[9]、Gairo virus[11]、马林塔尔及奥卡汉贾病毒[12]、温州病毒[13]及 Cardamones 及 Loei River virus[14]。另一组为塔卡里伯族,又称新世界族,包括塔卡里伯病毒、Junin virus、马丘波病毒、阿马帕里病毒、Cupixi virus、巴拉那病毒、拉丁美洲拉丁美洲病毒、皮秦德病毒、塔米埃米病毒、Flexal virus、瓜纳里托病毒、萨比亚病毒、花漾病毒、怀特阿罗约病毒、皮里陶病毒、熊峡谷病毒[15]、Ocozocoautla de Espinosa virus[16]、Allpahuayo virus[17]、托托河和 Big Brushy Tank viruses 病毒[18]、Real de Catorce virus[19]、卡塔琳娜病毒[16]、Pampa virus[20]、斯金纳箱病毒[16]、查帕雷病毒[21]、中皮斯河病毒[22]、Patawa virus[23]、及 Pinhal virus[24]。其中有些病毒还没有得到分离,只是从分子序列上分析而得到。所有啮齿类新世

界病毒都是从仓鼠分离，而塔卡里伯病毒是从蝙蝠体内分离。在患有蛇包涵体疾病的王蛇和蟒蛇体内还鉴定了一些与沙粒病毒遗传进化较远的病毒[25-26]和 Boa Av NL B3 病毒[25]。新、旧两族病毒之间关联不大，只有使用高滴度抗血清时才出现交叉反应。使用沙粒病毒结构蛋白特异性抗体研究发现 N 蛋白为组特异性抗原，而包膜糖蛋白 G1 和 G2 为型特异性蛋白[1,27]。

电子显微镜下沙粒病毒形态具有明显的特征[28]，最初将 LCM 病毒与马丘波病毒归为一类就是根据其形态特征，目前发现所有的沙粒病毒科病毒都具有这种形态特征。病毒有 3 个主要结构蛋白[27]。糖蛋白前体(GPC)加工产生蛋白 G1（50 000～72 000 道尔顿）和 G2(31 000～41 000 道尔顿)，构成病毒的包膜和刺突，为病毒型特异的中和抗原。另外，保留了一个稳定的信号肽，该信号肽是成熟糖蛋白复合物中一个必不可少的亚单位[29]。第 3 个主要蛋白是 N 蛋白(63 000～72 000 道尔顿)，与病毒 RNA 相连，为病毒核衣壳蛋白。完整的沙粒病毒可分离到 4 种 RNA。2 种为病毒特有并且是双义编码的：小 RNA(22S)编码 N 蛋白及病毒糖蛋白前体，大 RNA(31S)编码病毒 L 多聚酶和 Z 蛋白，Z 蛋白为调节元素[1]。另外 2 种为核糖体 28S 和 18S，其分离比例取决于不同的外部环境。

沙粒病毒成熟是以出芽方式从胞质膜释放，宿主蛋白成分参与构成病毒包膜。病毒感染 Vero 细胞后可形成不同的胞质内包涵体，包涵体可与抗 N 蛋白的抗体发生免疫反应，但不与抗 G1 或 G2 的抗体发生免疫反应。所有沙粒病毒均可被乙醚、氯仿、脱氧胆酸钠和酸性(pH＜5)物质灭活。β-丙烯内酯[28]和 γ 射线[29]均可破坏病毒的感染性，但不影响血清学测试中的反应性。

(二)丝状病毒科

丝状病毒包括埃博拉病毒和马尔堡病毒，具有共同的形态学特征、相似的基因组结构及结构蛋白[30]。马尔堡和埃博拉病毒 RNA 为不分节段的单股负链 RNA，约 19.1 kb 长，分子量为 4.0×10^6～4.5×10^6 道尔顿。与其他单股负链 RNA 病毒类似，病毒基因组呈线性排列。部分序列，特别是核衣壳和多聚酶蛋白，与副黏病毒有一定的相似性。然而，与丝状病毒其他蛋白序列相比，其蛋白序列明显不同。而且，根据显著不同的超微结构和血清学指标足可证实此类病毒属于丝状病毒科[2,28,32]。

马尔堡病毒和埃博拉病毒至少有 7 种病毒特异性的结构蛋白，由 7 个基因编码[2]。埃博拉病毒的核蛋白复合物包括 L(180 000 道尔顿)、N(104 000 道尔顿)、VP30(30 000 道尔顿)、VP35(35 000 道尔顿)蛋白，相互间松散连接。L 蛋白为 RNA 依赖的 RNA 聚合酶，VP35 的作用与副黏病毒和弹状病毒的 P 蛋白相似，GP(125 000 道尔顿)为主要刺突蛋白，VP40(骨架蛋白)和 VP24 是病毒多层包膜中的其他蛋白成分[2,32]。埃博拉和马尔堡病毒的 GP 蛋白可根据是否存在 N-和 O-连接糖苷加以区分，马尔堡病毒在体内外感染时缺少编码小可溶性糖蛋白的可读框，而埃博拉病毒有此读码框[34]。在 Vero/ Vero E6 或 MA-104 细胞生长时，埃博拉病毒不含有末端唾液酸，马尔堡病毒却富含(2-3)位连接的唾液酸。丝状病毒的基因组进化分析可清晰地将该类病毒分为 3 个属：埃博拉病毒属、马尔堡病毒属和新鉴定的奎瓦病毒属。埃博拉病毒属含有 5 个种：扎伊尔埃博拉病毒、苏丹埃博拉病毒、雷斯顿埃博拉病毒、塔伊森林埃博拉病毒(以前称 Ivory Coast 埃博拉病毒)及本迪布焦埃博拉病毒[33]。每种含有一个型别病毒，即埃博拉病毒(EBOV)、苏丹埃博拉病毒(SUDV)、雷斯顿埃博拉病毒(RESTV)、塔伊森林埃博拉病毒(TAFV)及本迪布焦埃博拉病毒(BDBV)。马尔堡病毒属含有 2 种病毒，即马尔堡病毒(MARV)和 Ravn 病毒(RAVV)[34]。尽管与人发病的临床关系不明确，奎瓦病毒属只含有一个病毒种，即库瓦病毒种，库瓦病毒种也只含有一个病毒即库瓦病毒(LLOV)。库瓦病毒没有被培养出，但在欧洲数只死亡的折翼蝠中检测到其全长基因组[35]。

尽管有独特的棒状形态学特征，丝状病毒与其他脂质包膜病毒包括沙粒病毒相似，对脂溶剂、β-丙烯内酯[30]、甲醛、紫外线及 γ 射线敏感[31]。病毒在室温可稳定存活数小时，60℃孵育 1 h 可破坏病毒。

二、流行病学和传播

(一)沙粒病毒科

沙粒病毒自然状态下存在于特定的哺乳动物

宿主中(表 99-1),在动物体内产生病毒血症和(或)毒尿症。可从啮齿类宿主的血液和尿样中分离到病毒。自然发生的人感染病例通常可追溯到直接或间接的啮齿类动物接触史。气溶胶感染也被认为是重要的自然感染途径。试图将节肢动物作为传播媒介没有成功,但偶遇可从伴有病毒血症的哺乳动物分离到病毒。39 个已命名的沙粒病毒科的哺乳动物来源的病毒中,9 个已知可引起人类疾病。拉沙病毒和马丘波病毒都发生过医疗相关性传播,Lujo 病毒也引起过一个 5 人感染的医疗相关性暴发,导致其中 4 人死亡[36]。由于拉沙热病毒在西非地区(主要是尼日利亚、塞拉利昂、几内亚和利比亚)广泛流行,它是最常见的向非流行地区输出的病毒性出血热,包括美国和欧洲发生的多个病例均属于该情况。

表 99-1 目前已确定的沙粒病毒和丝状病毒及其相关的人类疾病

病毒,分离时间	自然宿主	地理分布	自然发生的人类疾病	人类实验室感染
旧世界沙粒病毒				
LCM,1993	*Mus musculus*(家鼠)	美国、欧洲	不明原因发热性疾病,无菌性脑膜炎;罕见发生严重疾病	常见,通常较轻,但有 5 例死亡
拉沙病毒,1969	*Mastomys* sp.(多乳鼠)	西非,欧洲、美国及日本有输入性病例	拉沙热;病情从轻微到严重甚至致命	常见;通常严重
Mopeia, 1977	*Mastomys natalensis*(多乳鼠属)	莫桑比克,津巴布韦,坦桑尼亚	不明	无;缺乏经验
Mobala, 1983	*Praomys* sp.(软毛小鼠)	中非共和国	不明	无;缺乏经验
伊皮, 1984	*Arvicanthis* sp.(草鼠)	中非共和国	不明	无
Merino Walk, 1985	*Myotomys unisulcatus*(卖艺卡鲁鼠)	南非共和国	不明	无
Menekre, 2005(只有序列信息)	*Hylomyscus* sp.(非洲木鼠)	象牙海岸	不明	无
Gbagroube, 2005(只有序列信息)	*Mus* (*Nannomys*) *setulosus*(非洲侏儒鼠)	象牙海岸	不明	无
莫罗戈罗, 2007(只有序列信息)	*Mastomys natalensis*(多乳鼠)	坦桑尼亚	不明	无
Kodoko, 2007	*Mus* (*Nannomys*) *setulosus*(萨凡纳侏儒鼠)	几内亚	不明	无
Lujo, 2008	不明	赞比亚,南非共和国	致命性出血热	无
卢娜, 2009	*Mastomys natalensis*(多乳鼠)	赞比亚	不明	无
草鼠属, 2010(只有序列信息)	草鼠属 *rosalia*(多乳鼠)	坦桑尼亚	不明	无
南非小鼠, 2010(只有序列信息)	南非小鼠(萨凡纳侏儒鼠)	坦桑尼亚	不明	无
Lunk,2012(只有序列信息)	南非小鼠(萨凡纳侏儒鼠)	赞比亚	不明	无
Gairo, 2015	*Mastomys natalensis*(多乳鼠)	坦桑尼亚	不明	无
马林塔尔,2015	*Micaelamys*(蹊鼠属) *namaquensis*(纳马卡岩鼠)	纳米比亚	不明	无
奥卡汉贾,2015	*Micaelamys*(蹊鼠属) *namaquensis*(纳马卡岩鼠)	纳米比亚	不明	无
温州,2015	*Rattus norvegicus*(棕鼠), *R. flavipectus*(黄胸鼠), *R. losea*(黄毛鼠), *R. rattus*(家鼠), *Suncus murinus*(臭鼩)	中国	不明	未发现
温州,Cardamones 变异株,2015	*Rattus norvegicus*(棕鼠), *R. exulans*(太平洋鼠)	柬埔寨	发热及呼吸道症状	未发现

（续 表）

病毒，分离时间	自然宿主	地理分布	自然发生的人类疾病	人类实验室感染
Loei River，2016	*Bandicota indica*（袋狸鼠），*B. savilei*（萨维尔袋狸鼠），*Niviventer fulvescens*（针毛鼠）	泰国	不明	未发现
新世界沙粒病毒				
塔卡里伯，1956	*Artibeus* sp. 蝙蝠	特立尼达，西印度群岛	不明	1例疑似，症状中等
Junin，1958	*Calomys musculinus*（旱地晚祷鼠）	阿根廷	AHF	常见，通常严重
马丘波，1963	*Calomys callosus*（大暮鼠）	玻利维亚	BHF	常见，通常严重
Cupixi，1965	*Oryzomys gaeldi*（稻鼠）	巴西	不明	未发现
阿马帕里，1965	*Neacomys guianae*（圭亚那刚毛鼠）	巴西	不明	未发现
巴拉那，1970	*Oryzomys buccinatus*（巴拉圭稻鼠）	巴拉圭	不明	未发现
塔米埃米，1970	*Sigmodon hispidus*（刚毛棉鼠）	美国，佛罗里达	抗体阳性	未发现
皮秦德，1971	*Oryzomys albigularis*（托姆斯稻鼠）	哥伦比亚	不明	偶尔，轻微或无症状
拉丁美洲，1973	*Calomys callosus*（大暮鼠）	玻利维亚	不明	未发现
Flexal，1977	*Oryzomys* spp.（稻鼠）	巴西	未发现	1例，严重
瓜纳里托，1989	*Zygodontomys brevicauda*（短尾甘蔗鼠）	委内瑞拉	委内瑞拉 HD	未发现
萨比亚，1993	不明	巴西	VHF	两例，严重
Oliveros，1996	*Bolomys obscuris*（黑刀鼠）	阿根廷	不明	未发现
怀特阿罗约，1997	*Neotoma* spp.（木鼠）	美国墨西哥州，俄克拉何马州，犹他州，加利福尼亚州，科罗拉多州	不明	未发现
皮里陶，1997	*Sigmodon alstoni*（阿尔斯通棉鼠）	委内瑞拉	不明	未发现
Pampa，1997	*Bolomys* sp.	阿根廷	不明	未发现
Bear Canyon，1998	*Peromyscus californicus*（加利福尼亚鼠），*Neotoma macrotis*（大耳木鼠）	美国加利福尼亚州	不明	未发现
Ocozocoautla de Espinosa，2000（只有序列信息）	*Peromyscus mexicanus*（墨西哥鹿鼠）	墨西哥	不明	未发现
Allpahuayo，2001	*Aecomys bicolor*（双色木稻鼠），*Aecomys paricola*	秘鲁	不明	未发现
托托河，2001	*Neotoma albigula*（白喉木鼠）	美国亚利桑那州	不明	未发现
Big Brushy Tank，2002	*Neotoma albigula*（白喉木鼠）	美国亚利桑那州	不明	未发现
Real de Catorce，2005（只有序列信息）	*Neotoma leucodon*（白齿木鼠）	墨西哥	不明	未发现
卡塔琳娜，2007	*Neotoma micropus*（南部平原木鼠）	美国得克萨斯州	不明	未发现
斯金纳箱，2008	*Neotoma mexicana*（墨西哥木鼠）	美国亚利桑那州	不明	未发现

（续 表）

病毒，分离时间	自然宿主	地理分布	自然发生的人类疾病	人类实验室感染
查帕雷，2008	不明	玻利维亚	单纯的致死性 HF 病例	未发现
皮斯河中游，2015	*Neotoma micropus*（南部平原鼠）	美国德克萨斯州	不明	未发现
帕塔瓦，2015（只有序列信息）	*Oecomys rutilus*（红树林灰鼠），*Oecomys auyantepui*（北亚马逊树林灰鼠）	法属圭亚那	不明	未发现
皮尼亚尔，2015（只有序列信息）	*Calomys tener*（精致威斯特小鼠）	巴西	不明	未发现
未分类的沙粒病毒				
金门，2009	*Boa constrictor*（大蟒蛇）	美国加利福尼亚州	不明	未发现
科利尔维尔，2009（只有序列信息）	*Boa constrictor*（大蟒蛇）	美国加利福尼亚州	不明	未发现
CAS，2009（只有序列信息）	*Corallus annulatus*（有环树蟒）	美国加利福尼亚州	不明	未发现
Boa Av NL B3，2013（只有序列信息）	*Boa constrictor*（大蟒蛇）	荷兰	不明	未发现
丝状病毒				
马尔堡，1967	*Rousettus aegyptiacus*（果蝠）	输入到德国和南斯拉夫；肯尼亚，津巴布韦，刚果民主共和国，安哥拉，乌干达；美国和荷兰单个输入病例	致死病例	可以
埃博拉，1976	蝙蝠？	刚果民主共和国，加蓬，刚果共和国，南非输入性病例	致死病例	可以
苏丹，1976	蝙蝠？	苏丹，乌干达	致死病例	未发现
雷斯顿，1989	蝙蝠？	菲律宾；美国和意大利输入性感染的灵长类动物	无症状病例	接触非人类灵长类动物的人、养猪场工人及屠宰场工人血清阳转
塔伊森林，1994	蝙蝠？	象牙海岸	未死亡的发热性疾病	未发现
本迪布焦，2007	蝙蝠？	乌干达，刚果民主共和国	致死病例	未发现

（二）丝状病毒科

由于少于50%的确诊病例出现任何形式的出血症状，马尔堡和埃博拉出血热现在指的是马尔堡病毒病（MVD）和埃博拉病毒病（EVD）。马尔堡病毒在1967年首次发现，当时31个德国人和南斯拉夫人在接触从乌干达进口的猴制备的肾细胞、原代组织培养或患者时感染了病毒[2,32]。埃博拉病毒首次出现于2次大的疾病暴发，这2次大暴发于1976年几乎同时在扎伊尔（现在的刚果民主共和国）和苏丹（现在的南苏丹）发生。病例数超过500例，其中扎伊尔的病死率为88%，苏丹病死率为53%。尽管埃博拉病毒在两处是同时出现的，血清学分析及序列分析显示这些病毒属于不同的种，即 EBOV 和 SUDV[2]。在1989年和1990年，从 Reston VA 和 Perkasie PA 检疫区的猕猴体内分离到一种新的埃博拉病毒，即 RESTV，这些猕猴是从菲律宾进口[39]。RESTV 在1992年菲律宾出口到意大利 Siena[40-41]及1996年得克萨斯州 Alice[42]的猴子体内再次出现。而在1994年，仅有的已知感染人的 TAFV 在一个调查象牙海岸（Côte d'Ivoire）死亡大猩猩的兽医体内

被发现[38]。1995—2005年，EBOV在扎伊尔(现在的刚果民主共和国)、加蓬及刚果共和国散发性出现，一些人感染病例与接触受到感染的非人灵长类动物有关[3,39]。SUDV主要出现在乌干达和南苏丹(现在的南苏丹)，导致了2000年(425个病例)、2004年(17个病例)的暴发及2011年、2012年、2013年系列小规模聚集病例的出现[40-41]。1998—2000年，马尔堡病毒包括MARV及RAVV在刚果民主共和国的东部地区金矿工人中暴发并有继发感染病例[2]。基于逆转录PCR(RT-PCR)及血清结果推测该暴发与金矿中发现的蝙蝠有关[42]。最高的血清阳性率出现在居住洞穴的埃及罗西特蝠(埃及果蝠种)。已知最大的MVD暴发发生在2005年安哥拉北部Uige地区，引起252个病例感染，227个死亡[2,43]。暴发的来源目前还不清楚。

2005年，加蓬发现RT-PCR检测阳性的携带埃博拉病毒的果蝠[44]，这也是首次在蝙蝠中发现埃博拉病毒的遗传物质。2007和2008年，埃博拉病毒在刚果民主共和国西开赛省的同一地区引起了2次小的暴发(http://www.who.int/csr/don/2009_02_17/ en/index.html)。同样在2007年，在乌干达西部本迪布焦区及其周边地区埃博拉暴发时分离了一种新的种即BDBV[33]。从2007年8—12月共报告131例疑似、可能或确诊病例。2008年，在实验室调查2007年菲律宾农场高病死率猪的组织样本时分离到RESTV，该病曾被认为是不典型猪繁殖与呼吸综合征(atypical porcine reproductive and respiratory syndrome，PRRS)[45]。而PRRS和Circo 2病毒也是从猪中分离，尚不清楚RESTV在多大程度上引起疾病症状。RESTV在疾病发生中的作用仍不清楚。2011年，在进行常规PRRS病毒筛查时，在中国上海的仔猪中通过RT-PCR检测到RESTV[46]，这些发现表明RESTV可能在体内持续地保存并通过贸易传播到其他国家。尽管产生了可检测水平的抗体并且病毒也能排出体外，然而，从菲律宾猪分离的RESTV实验性感染猪没有引起明显的疾病[18]。由于1990年美国4名检疫场所的工作人员出现了RESTV的抗体，然而没有发病，菲律宾的暴发疫情中一些屠宰场和养猪场的工人也出现了抗体却没有发病(http://www.who.int/csr/resources/publications/ HSE_EPR_2009_2.pdf)。这些现象表明这个病毒种类似乎比丝状病毒的其他种类对人的致病力要低。

2007年，来自乌干达Ibanda附近地区的4例铅矿工人感染了马尔堡病毒，3例为MARV，一例为RAVV。2例工人死亡，后续的调查通过RT-PCR检测到马尔堡病毒阳性的埃及果蝠，并第一次从这个潜在的储存宿主分离到病毒[47-48]。2008年，2例感染MARV的旅行者被诊断为MVD，这2例旅行者均去过乌干达西部同一个有埃及果蝠栖息的山洞(伊莉莎白女王国家公园的巨蟒洞)。第一个病例是来自荷兰的妇女，后来在荷兰死于MVD[49]。第二个病例是来自美国科罗拉多州的妇女，在美国住院后，这个患者后来康复了，她的诊断也是回顾性调查确定的。2018年，在乌干达捕获的埃及果蝠中共获得了21个马尔堡病毒毒株。2011年乌干达报告了1例SUDV相关的EVD[50]，但是在2012年，出现了4起无相互关联的暴发疫情：7～8月乌干达Kibaale省出现的SUDV、8—10月刚果民主共和国Isiro出现的BDBV、11月乌干达Luwero省出现的SUDV[51]。2014年初始，几内亚卫生部报告了该国森林地区EDV暴发。本次由EBOV引起的暴发迅速成为最大的一次暴发事件，导致超过28 000的确诊及可能病例，大部分病例在几内亚、塞拉利昂和利比亚。世界多个公共卫生研究机构及实验室部署和资助了多达32个移动实验室在所有受感染国家进行EVD的快速检测。大部分的这些实验室都使用了FDA/WHO批准应急使用的分子检测方法。多个患者疏散到了欧洲和美国。塞内加尔、马里、尼日利亚和美国还报告了一些旅行者感染引起的二级感染病例[52]。最新信息可见http://www.who.int/csr/disease/ ebola/situation-reports/en/。多个发达国家包括美国的医护人员被感染。作为应对，美国CDC制定了多等级的医院准备，包括①前线医疗场所；②埃博拉评估医院；③埃博拉治疗中心。评估了美国照顾埃博拉患者的81个场所，最终，55个医院由国家健康部门认证作为埃博拉治疗中心。2017—2018年，刚果民主共和国的下乌里、赤道、北基伍省出现了3次独立的EVD(由EBOV)散发性暴发。截至撰写本文时(2018年10月14日)，本次持续的暴发已引起211例感染，135例死亡。

三、临床意义

病毒性出血热患者常出现相似的、非特异的临床征象，与疟疾、伤寒及咽炎症状相似。结合旅行史、接触史及特定的病毒学手段，有利于快速诊断疾病、及时隔离患者、进行临床治疗和采取公共卫生措施。美国处置 EVD 的指南文件在 下列网站可查询到（http://www.cdc.gov/vhf/ebola/index.html）。

（一）沙粒病毒科

在已知的致人类疾病的沙粒病毒中，LCM 病毒导致的严重感染最为少见[53]。小部分的 LCM 感染呈亚临床感染。典型的 LCM 病例表现为发热、肌痛、眼眶后疼痛、虚弱、厌食。特别是发病的第 1 周，主要症状包括咽痛、寒战、呕吐、咳嗽、胸骨后痛、关节痛。可出现皮疹但少见。大约 1/3 的患者可再次出现发热并伴有神经系统疾病发生，通常为无菌性脑膜炎，脑膜脑炎不常见。几乎所有患者都可痊愈，因而 LCM 感染为一过性感染，即使出现神经系统疾病也极少引起死亡。最近发现 LCM 病毒的宫内感染是中枢神经和视觉系统出生缺陷的主要病因之一[54]。已有几个报道 LCM 感染导致的死亡病例，这些病例是器官移植中接受了 LCM 病毒感染捐献者器官的免疫抑制人群[55-57]。

拉沙、Junin 和马丘波病毒引起的感染较为严重。拉沙热病例通常在发病后 5～7 天入院，症状包括咽痛、严重的下背部疼痛、结膜炎。这些症状通常在随后的 1 周加重，伴并有恶心、呕吐、腹泻、胸腹部痛、头痛、咳嗽、头晕和耳鸣。后期常出现肺炎、胸腔和心包积液并出现摩擦音。可出现斑丘疹，但明显的出血仅出现在一部分极为严重的病例。穿刺部及黏膜的出血和黑粪较为常见。尽管感染较轻或没有出现明显的感染，15%～20% 的住院病例死亡，死亡原因主要是由于肝、肺及心肌损伤造成的特发性心血管衰竭。拉沙热病例很少出现神经系统征象，在疾病开始恢复时可出现耳鸣和耳聋。怀孕妇女患拉沙热通常病情特别严重，其死亡率也较高。此类疾病在儿童的病程与成人相似，但在婴儿表现为“肿婴综合征”，其特征表现包括全身水肿、腹部肿胀、出血等。临床实验室检验对拉沙热诊断通常没有太大帮助，特别是在拉沙热罕见地区或对那些轻型、不典型的病例，需要利用特定的病毒学检验。

对由 Junin 病毒引起的阿根廷出血热和马丘波病毒引起的玻利维亚出血热的临床特征已有了充分认识。但对瓜纳里托病毒引起的温州出血热、巴西的萨比亚病毒或查帕雷病毒（玻利维亚 1 例确诊病例）的了解还很少[3]。然而所有这些感染相互之间的相似性使人们可以将它们划归为一体，即南美或新世界沙粒病毒出血热。潜伏期为 7～14 天，很少有亚临床病例发生。随后逐渐出现发热、厌食和不适等，可持续几天，在患者就诊时可出现胃肠道、心血管和神经系统症状。初次体检时，阿根廷出血热和玻利维亚出血热患者有体温升高、急症体征和轻度低血压。患者常诉有背痛、上腹痛、头痛、眼眶痛、畏光、眩晕、便秘或腹泻、咳嗽等。面颈及胸部潮红，以及牙龈出血也很常见。几乎所有病例都出现黏膜疹、瘀斑，细小的囊泡散在分布于充血的腭部及咽部。半数以上的患者出现神经系统症状，从轻微的易怒、嗜睡到步态异常、上肢远端震颤，严重者可出现昏迷、谵妄、惊厥等。发病第 2 周临床症状减轻，可出现并发症。并发症包括广泛的瘀斑性出血、针刺部渗出、黑粪症及呕血。这些毛细血管损伤和血小板减少症的表现尚不足以造成危及生命的出血。然而，低血压和休克，常伴有严重的中枢神经系统症状，这些病例中，15% 的患者出现死亡。幸存者在第 3 周临床表现明显改善。患者恢复较慢，虚弱、疲乏及精神症状可持续数周，并且一部分患者会出现“后期神经系统综合征”，表现为头痛、小脑震颤、脑神经麻痹。与拉沙热病例不同，临床实验室检测通常很有意义。总白细胞计数常下降到 1000～2000 个/mm^3，但分类无变化。血小板计数轻度下降，通常为 25 000～100 000/mm^3，偶尔会很低。常规的凝血性指标通常正常或轻度改变，但严重病例可出现弥散性血管内凝血。

Lujo 病毒只在南非暴发 1 次，有 5 例确诊病例，患者潜伏期 7～13 天，然后出现非特异的发热伴头痛和肌痛[36]。3 例高加索人在发病的 6～8 天出现明显的麻疹样皮疹，但 2 例非洲患者没有这样的皮疹。4 例死亡病例的病程呈双相。发病后 1 周，即第 2 相，以呼吸困难、神经系统症状和

循环衰竭快速恶化为特征。所有患者都在入院时出现血小板减少（血小板计数 $20\times10^9\sim104\times10^9$/L）。3例患者白细胞计数正常，2例患者在入院时白细胞减少，但有4例患者在病程中出现白细胞增加，最后1例患者（唯一的存活病例）以利巴韦林进行了治疗。

致死性的沙粒病毒感染，组织病理改变包括肝细胞多中心坏死伴随少量炎性反应、间质性肺炎、心肌炎和淋巴组织缺失。实质细胞和单核巨噬细胞系统出现广泛的沙粒病毒抗原，比形态学病变更明显，见图99-1。

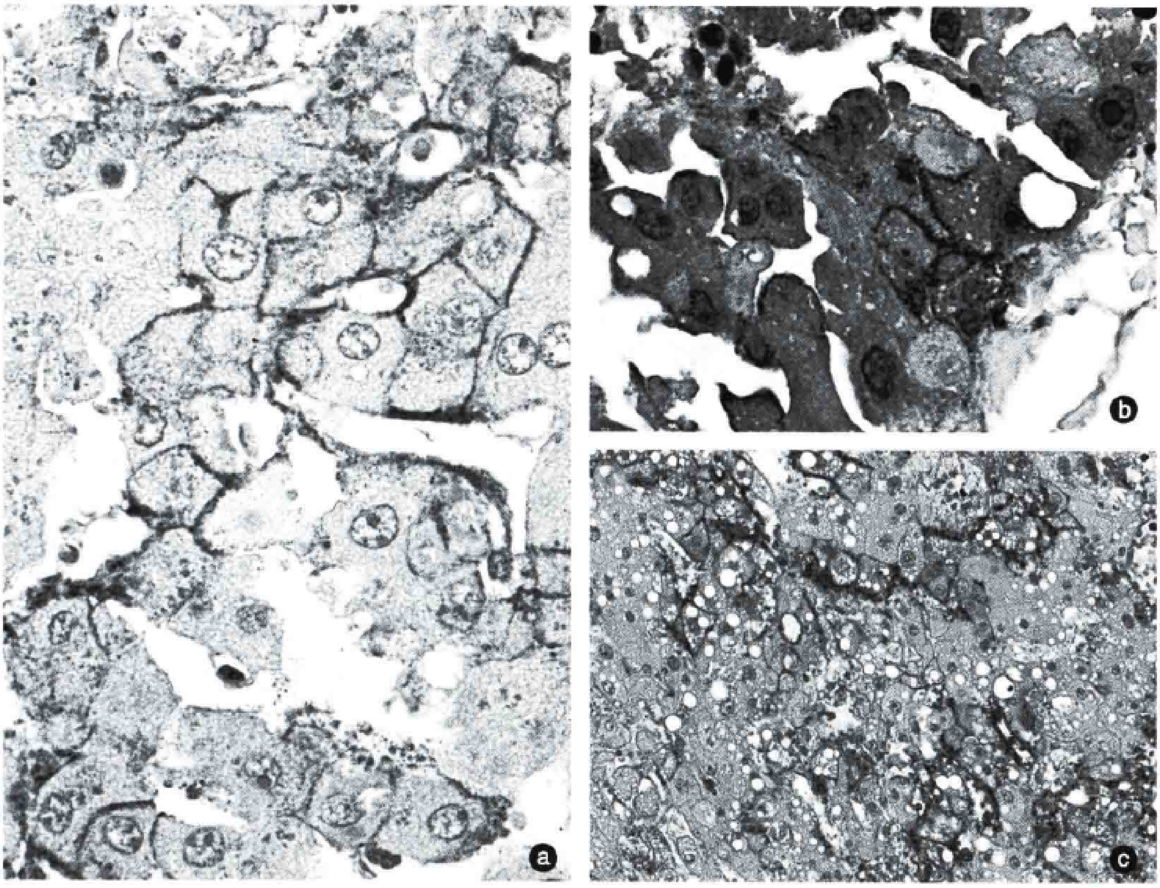


图99-1　免疫组织化学法观察感染拉沙病毒(a)、Lujo病毒(b)(放大倍数，×158)和LCM病毒(c)(移植患者)(放大倍数，×50)的患者肝细胞质和肝窦壁细胞内出现大量病毒抗原(碱性磷酸酶染色，苏木素-酚红反染)，见彩插

(二)丝状病毒科

EVD和MVD病例的临床特征相似，尽管个体之间在症状和体征上会有所差别。最近的研究总结了资源丰富及贫乏地区EVD的临床特征和临床管理[58-60]。潜伏期4～16天，发病较急，表现为发热、寒战、头痛、厌食和肌痛。随后出现恶心、呕吐、咽痛、腹痛和腹泻。初次就诊时患者呈现明显的病态，脱水、情感淡漠及不能定位。咽喉部和结膜感染常见。几天内出现特征性的躯干部斑丘疹、瘀斑和黏膜出血。同瘀斑、针刺部位及黏膜出血相同，常见胃肠道出血，并伴有剧烈的上腹部疼痛。在西非的EVD暴发疫情中，出血已很少见了，但剧烈的腹泻很常见，可引起严重的脱水(http://www.cdc.gov/vhf/ebola/hcp/clinician-information-us-healthcaresettings.html)。在包括血液在内的体液中发现高滴度的EBOV，这对那些照顾埃博拉患者的人来说是一个主要的危险因素。患者死亡前不久出现休克，常发生在发病后6～16天。凝血因子参数异常包括纤维蛋白原裂解产物产生、凝血酶原及部分血小板作用时间延长，均提示典型的疾病晚期出现的弥散性血管内凝血并与多器官衰竭相关[61]。临床实验室检测发现在疾病早期出现白细胞减少，有时在疾病晚期可中度升高。血小板计数在出血期下降到50 000～100 000个/mm^3。当剧烈呕吐和腹泻时

可出现严重的低血钾。肝脏酶和肌酐水平与疾病晚期肝肾衰竭的程度呈正相关。

致死性的丝状病毒感染，主要器官如肝、脾、肺、肾、皮肤和生殖腺弥散性的感染和坏死很常见。埃博拉感染死亡病例可见广泛的肝细胞坏死伴随特征性的病毒包涵子形成。所有的丝状病毒感染都有淋巴损伤和微血管感染和损伤。通过免 疫组化和原位杂交方法可在主要器官发现丰富的病毒抗原和核酸（图 99-2 和图 99-3）。对于恢复的患者，病毒可以在精液中持续几个月，此现象首先于 1967 年在感染 MARV 的患者中发现，在西非感染 EBOV 的恢复期男性患者中很常见[62-63]。罕见情况下，导致出现症状后超过 470 天还可引起病毒的性传播[64]。其他罕见的 EBOV 存在于免疫豁免器官包括眼睛（引起葡萄膜炎）和脑脊液的情况可在病毒血症清除 9 个月后还能检测到[64-65]。

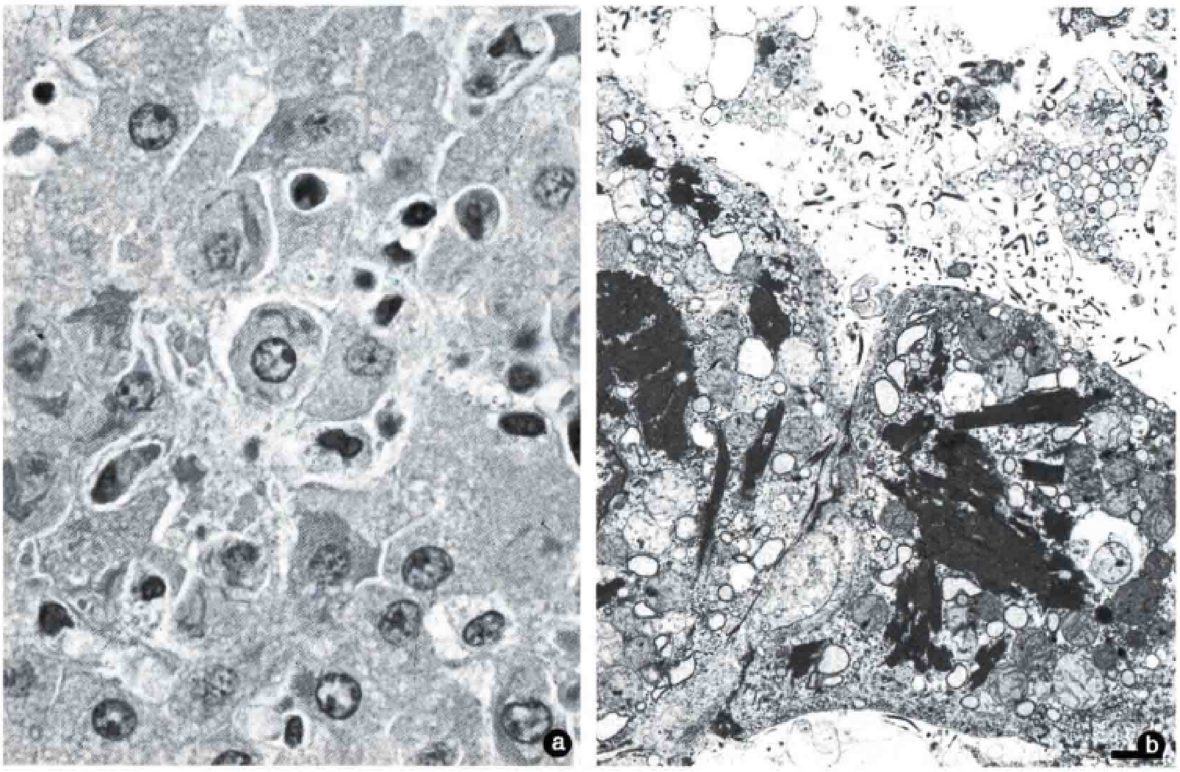


图 99-2 埃博拉病毒出血热

注：a. 肝切片显示肝细胞坏死、大量的胞质内和嗜酸粒细胞内埃博拉病毒包涵体，以及肝窦壁肿胀和充血；苏木素-伊红染色（放大倍数，×250）。b. 肝薄层切片电子显微镜图可见数个埃博拉病毒包涵体。包涵体由病毒核衣壳组成，常见于纵向切片中。窦间也可见大量病毒颗粒。标尺，100 nm（经 C. S. Goldsmith 允许使用），见彩插

VHF 的治疗遵循以下原则：维持体液平衡和控制出血的对症治疗。如果在病程的早期使用抗病毒药物利巴韦林可有效降低拉沙热的死亡率及病程[3,66]。利巴韦林治疗 Junin 出血热同样有效而且也被用于玻利维亚出血热、Lujo 感染及免疫系统受损的 LCM 感染[3,36,56]。最近报道化合物 KP-146[(5-(5-(2,3-dihydrobenzo[b][1,4] dioxin-6-yl)-4′-methoxy-[1,1′-biphenyl]-3-yl) thiophene-2-carboxamide]在培养的细胞中具有强的抗 LCM 病毒活性[67]。开发拉沙病毒疫苗的主要挑战在于病毒遗传变异非常高而且对于生产厂家来说市场盈利非常小。目前还没有商品化的抗丝状病毒药物，但在非人类的灵长类动物模型发现暴露后的治疗包括重组人激活蛋白 C、小干扰 RNA 和单克隆抗体的鸡尾酒免疫治疗，均有效果[68-69]。西非埃博拉暴发时，对于患者进行了安慰性的恢复期血浆、单克隆抗体鸡尾酒、抗病毒治疗，其疗效不一[69-71]。现在还没有注册的沙粒病毒和丝状病毒疫苗。已开发了几个抗埃博拉病毒感染的疫苗候选物并在人类临床试验中体现出良好的前景[72-77]。

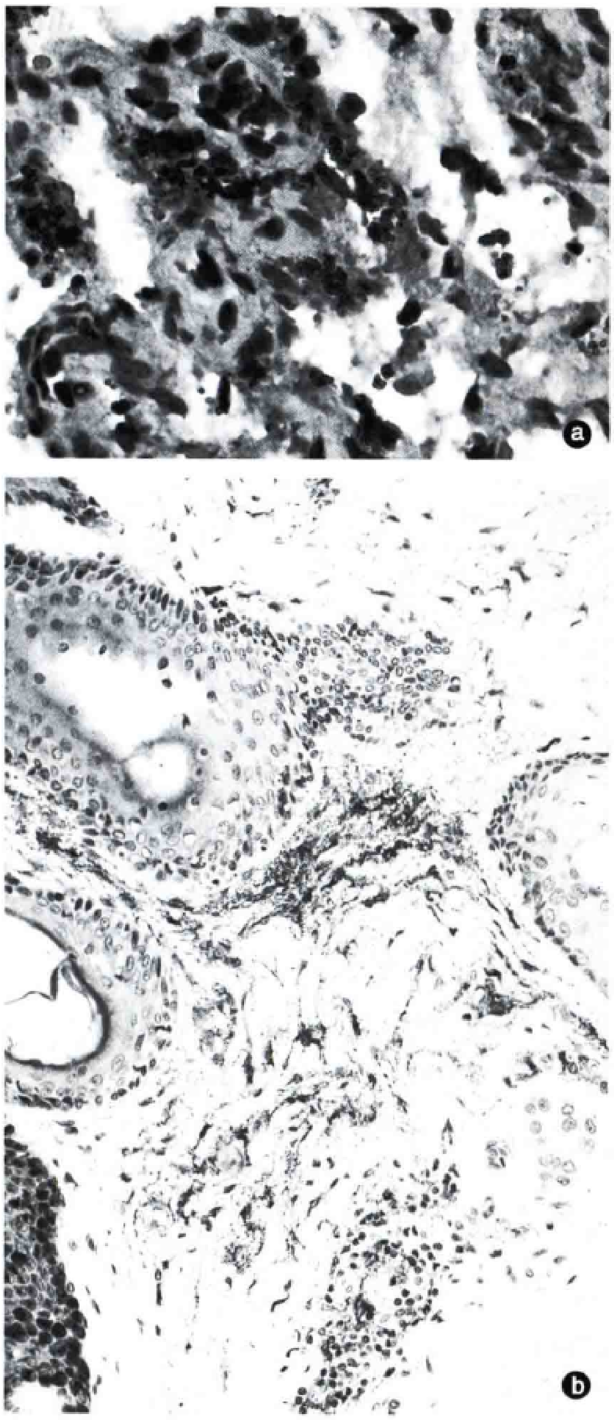


图 99-3 a. 免疫组织化学法观察到赖斯顿型埃博拉病毒感染的猪淋巴结出现大量的埃博拉病毒抗原(红色)。放大倍数，×158。b. 与埃博拉病毒抗原的免疫染色一样，皮肤也出现大量病毒。放大倍数，×50(碱性磷酸酶染色，苏木素-酚红反染)，见彩插

四、样本的采集、运输和储存

(一)安全和保障

一些沙粒病毒(拉沙、Junin、马丘波、萨比亚、瓜纳里托、查帕雷和 Lujo virus)和所有的丝状病毒被归为生物安全 4 级病原，因为它们对实验室人员为高感染性，必须采取适当的安全防护措施[78](http://www.cdc.gov/vhf/ebola/hcp/ interim-guidance-specimen-collection-submissionpatients-suspected-infection-ebola.html#update1)。对于实验室来说，针对 EBOV 撰写的基础指南可在下面的网站找到，该指南同样可应用于其他可引起严重后果的病原(https://www.cdc.gov/vhf/ebola/healthcare-us/laboratories/index.html)。其中大部分在美国被卫生与公众服务部划分为选择性病原，同样需按安全防护措施处置(http:// www.selectagents.gov/SelectAgentsandToxinsList.html 和 http://www.selectagents.gov/Regulations.html)。然而，对沙粒病毒 LCM 病毒来说，诊断样本和细胞培养操作在生物安全 2 级实验室(biosafety level 2,BSL2)进行，而可产生高浓度气溶胶的活动需在生物安全 3 级实验室(BSL3)进行。埃博拉病毒和马尔堡病毒最近被划为一级病原，对一级病原和毒素的处置、使用或运输有特定的管理法规(http://www.selectagents.gov/ faqgeneral.html#sec1q6)。至少需要进行屏障护理，护理人员和处理诊断样本时应该戴一次性帽子、长外衣、鞋套、外科手套和面具(最好是装有高效过滤器的全脸呼吸器)[79]。如果手套直接接触血液或分泌物应立即消毒。操作这些样本和组织包括恢复期患者的血清具有很大的生物危险性，在生物安全 4 级实验室(BSL4)外应尽量少操作[78-79]。使用真空采血管(如 BD 公司的真空采血管)要比使用注射器和针头安全得多，因为后者将其内容物转移到另一管时必须拆散。产生气溶胶的操作如离心应尽量避免，必须要进行时，应采取保护措施如将仪器放在Ⅰ或Ⅱ类层流罩中。对于特定的操作，将样本用曲拉通－100 和加热进行失活处理可很大程度减少样本的感染性。60℃加热 1 h 可降低诊断样本的感染性，但是不影响热稳定的物质如电解质、血尿氮和肌酐[80]。当使用仪器时，以 ^{60}Co 伽马射线消毒是一个较好的方法。使用硫氰酸胍(适当的比例，至少 1∶5或 1∶10 的裂解试剂)从感染性样本提取 RNA 时应在层流罩中操作。需要指出的是，一些裂解液如果不在特定条件下则不能完全灭活含高滴度病毒的样本[80-81]，此步后提取的 RNA 不再有感染性。

(二)标本采集

对病毒分离、抗原检测和 RT-PCR 检测的样本，血清、肝素化血浆或全血样本应在发病的急性发热期采集，并在干冰或液氮中保存。美国埃博拉样本采集和递交的指南最新信息见网站(http:// www. cdc. gov/vhf/ebola/hcp/interim-guidance-specimencollection-submission-patientssuspected-infection-ebola. html)。在较高温度(高于－70 ℃)保存会使病毒的感染性下降。为了诊断目的，从恢复早期采集的血液尽管出现了抗体但还是有感染性，也应该根据指南处理[70-72]。除了血样，咽漱液也被用于沙粒病毒(拉沙、Junin 和马丘波)感染的病毒分离。LCM 病毒在发病的第 1 周可从急性期血清中分离，通常在脑膜炎发病期的脑脊液标本，以及尸检脑组织中分离到，从咽漱液和尿很难分离病毒。从器官移植免疫抑制者的血液中很容易分离到 LCM 病毒。查帕雷和 Lujo virus 在疾病急性期血中分离到。丝状病毒通常在急性期血样中分离到。各种样本包括咽漱液、咽分泌物、尿、软组织渗出物、精液及前眼液都分离到丝状病毒，即使是恢复晚期的样本也偶尔分离到。

(三)尸检标本

拉沙、马丘波、Junin 病毒、马尔堡病毒和埃博拉病毒都很容易从尸检的脾、淋巴结、肝、肾 样本分离到，但很少从脑或其他中枢神经系统分离到。尸检应该在有限基础内进行而且仅仅可被受过严格训练的人员，如美国 CDC 感染性疾病病理部的人员操作。值得注意的是拉沙病毒通常从感染的孕妇的胎盘中分离到。LCM 病毒从器官移植后出现严重疾病甚至死亡病例的几个活检组织或尸检样本中分离到。Lujo virus 从尸检的肝脏中分离到。福尔马林固定的组织和石蜡包埋块适合组织病理学和免疫组织化学鉴定病毒抗原，这些样本应在室温保存和运输。

(四)运送

如果根据临床和流行病学证据怀疑沙粒病毒或丝状病毒感染，临床医生在运送样本前应咨询当地卫生行政部门和下面列出有 BSL4 设施及能够诊断这些病原的相关实验室。所有感染性材料的检测时，样本应按照有关规定包装[国际航空联盟(IATA)](http://www. iata. org/index. htm)。样本应该快递，初步结果可以在收到样本后的 24～48 h 内得到。

1. 疾病预防控制中心，特殊病原部，1600 Clifton Rd. Atlanta，GA30333。电话：(404) 639-1115 传真：(404) 639-1118 网址：http://www. cdc. gov/ vhf/ebola/hcp/interim-guidance-specimencollectionsubmission-patients-suspected-infectionebola. html。

2. 美军传染病医学研究所，总部，Fort Detrick，1425 Porter St.，Frederick，MD 21702-5011。电话：(301) 619-2833. 传真：(301) 610-4625

3. 应用微生物及研究中心，新发和危险病原部，Manor Farm Road，Porton Down，Salisbury，iltshire SP4 0JG，英国。电话：0980-612224。传真：0980-611310。

4. 国立传染病研究所，特殊病毒性病原实验室，1 Modderfontein Road，Private Bag X4，Sandringham，Johannesburg，南非。电话：27 (11) 3866376 or 0829039131。传真：27(11)8823741。

5. Bernhard-Nocht 热带医学研究所，病毒学部，Bernhard-Nocht-Str 74，20359 汉堡，德国。电话：49 (40) 42818 421。

6. 加拿大公共卫生署，国家微生物实验室，特殊病原项目部，1015 Arlington St.，温尼伯，曼尼托巴省 R3E 3R2，加拿大。电话：(204) 789-6019。

7. Unite de Biologie des Infections Virales Emergentes CNR des Fievres Hemorragiques Virales，巴斯德研究院，21 avenue Tony Garnier，69365 Lyon cedex 07，法国。电话：33 043728244340。

欧洲(http://www. enivd. de/index. htm)和美国也有几个 BSL4 实验室可进行该类病毒诊断，不久的将来可能会有其他的 BSL4 实验室具有诊断能力。

五、直接检查

(一)电子显微镜检查

单个的沙粒病毒颗粒呈多形性，大小为 60～280 nm(平均 110～130 nm)(图 99-4，上)。病毒结构蛋白外包裹着一层包膜，上面有 10 nm 长的棒状突起。病毒呈非对称性。最明显的形态特征

是病毒体存在着数个电子密度颗粒(通常 2～10 个),相互之间通过细小纤维相连。这些颗粒直径为 20～25 nm,生化及寡核苷酸分析显示与宿主细胞的核糖体相同[28]。虽然沙粒病毒颗粒的形态特征不如丝状病毒明显,免疫电镜也可对沙粒病毒感染做出诊断。

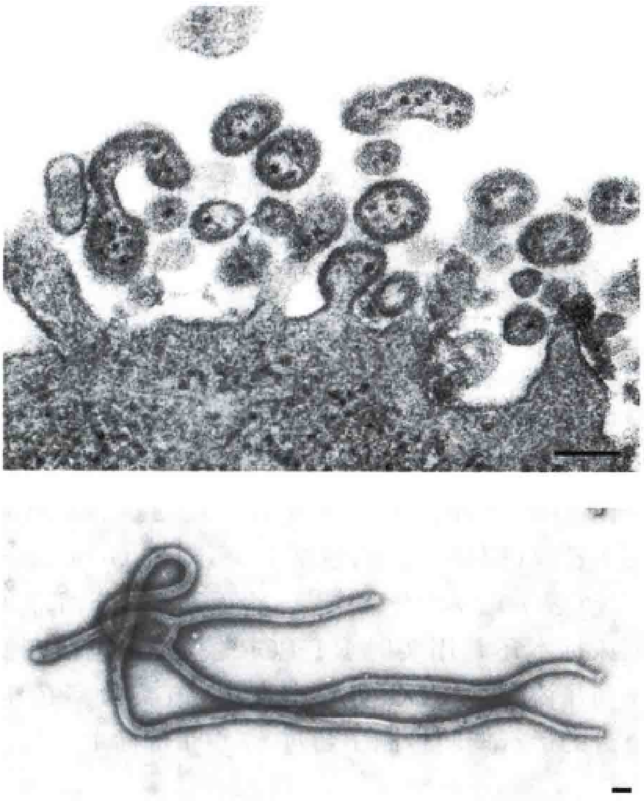


图 99-4 组织培养细胞中 LCM 和埃博拉病毒超微特征。(上)LCM 病毒(一种沙粒病毒)呈现多行性包膜状颗粒,内部有核糖体样颗粒。标尺,100 nm(经 C. S. Goldsmith 允许使用)。(下)埃博拉病毒分离株(一种丝状病毒),呈 80 nm 宽的丝状包膜颗粒。有些丝可达 15000 nm 长。标尺,100 nm(经 C. S. Goldsmith 允许使用)

利用电子显微镜可直接从发热期采集的肝素抗凝血和尿标本中,以及组织培养上清液中观察到马尔堡和埃博拉病毒。结合病毒体的大小和形态特征可进行丝状病毒诊断[28,37,82]。丝状病毒颗粒非常大,典型的长 790～970 nm,直径 80 nm。电子显微镜负染观察病毒长度差异极大,有时可达 14 000 nm,有时呈分枝状、环状、"6"字形,这可能是由于病毒出芽过程中多个病毒核酸被共同包裹所致(图 99-4,下)[28,82-83]。

埃博拉病毒包涵体体通常在肝脏的薄层切片中观察到。由病毒核衣壳组成的包涵体基本都在纵向切片中观察到。在窦间可见大量病毒颗粒(图 99-2b)。通过免疫电子显微镜技术可区分和鉴定马尔堡病毒或埃博拉病毒[82-83]。

(二)抗原检测

间接免疫荧光法染色技术已经在涂片及自然干燥的肝、脾、肾悬液中成功检出马尔堡病毒感染相关的细胞内包涵体,受感染的干的柠檬酸抗凝的血涂片中用间接免疫荧光法技术也观察到马尔堡病毒抗原块。此技术也成功用于血液、组织及鼻甲骨涂片中 RESTV 的诊断,同时也可用于外周血细胞和尿沉淀中 Junin virus 的检测。埃博拉感染的肝经苏木素-伊红染色可见细胞坏死及大量的胞质内和嗜酸性粒细胞内的包涵体及窦状肿胀和充血(图 99-2a)。福尔马林固定标本中沙粒病毒和丝状病毒的免疫组织化学检测效果远好于冷冻的丙酮固定切片的间接免疫荧光法检测[84-87]。用冷冻切片进行诊断意义不大且具有危险性,特别是其检测敏感性的阈值超过 6 $\log_{10}$ PFU/g。沙粒病毒检测时,福尔马林固定的切片经脱蜡、脱水、蛋白酶消化后,与免疫的兔血清或鼠单克隆抗体混合物进行反应以检测病毒抗原[37,86-87]。再与生物素标记的二抗反应,链霉亲和素-碱性磷酸酶反应系统显色。其他显色物的使用可提高敏感性并降低背景[84]。2007－2008 年,在菲律宾猪不同组织包括淋巴结中检测到家畜流行性雷斯顿病毒抗原及埃博拉病毒抗原[45](图 99-3a)。1995 年在扎伊尔使用免疫组织化学技术成功在埃博拉出血热患者的福尔马林固定皮肤活检标本中检测出埃博拉病毒[3,87](图 99-3b)。免疫组织化学技术还被用于证实 1 例从西非返回新泽西州致死性拉沙热病毒感染的诊断(图 99-1a)。最近,正是应用免疫组织化学实验对南非病例肝组织检测发现是沙粒病毒(图 99-1b),从而发现了 Lujo virus[36]。通过器官移植出现的聚集性 LCM 患者[55-56],可在多个器官观察到大量的 LCM 病毒抗原(图 99-1c)。

抗原捕获酶联免疫吸附法可对病毒血症期血清和组织培养上清中沙粒病毒和丝状病毒进行定量测定,用于此类病毒的早期检测和鉴定[89-91]。这种技术可有效地从热-去垢剂处理、β-丙内酯或射线灭活的样本中检测病毒抗原,因此无需严格的消毒设施。该实验的敏感性阈值可达 2.1～2.5 $\log_{10}$ PFU/ml,足以检出大多数急性 VHF 病毒血

症中的病毒抗原和咽漱液和尿样本中的病毒。而且，抗原捕获酶联免疫吸附法比基于RT-PCR的检测方法对遗传变异兼容性更强，因而更可能成功地检测出新病毒[16,33]。以一个或多个高效、特异的单克隆抗体代替多抗(大部分是针对核蛋白和VP40)，一般来说可以提高抗原捕获酶联免疫吸附法实验的敏感性和特异性[91-93]。西非EVD暴发期间，成功开发了多个可检测全血和血浆的侧流检测方法[94-97]。尽管这些方法获得了FDA紧急使用授权(emergency use authorization, EUA)，但是据报道与基于RT-PCR的检测方法相比，该类方法敏感性较低，而且存在假阳性和假阴性问题[98-99]。

(三)核酸检测

由于操作简便、较高的检测敏感性及初始核酸提取步骤就可完全灭活样本的优点，RT-PCR联合随后的基因分析已代替基于抗原-抗体反应的诊断方法成为快速准确鉴定主要方法[81,100]。然而，RT-PCR方法容易造成交叉污染，我们仍然鼓励可能情况下与传统的方法[病毒分离和(或)血清学]联合使用。实时RT-PCR方法具有操作自动化、结果报告机械化及可快速对病毒载量进行定量的优势，这些特点可用于评估患者恢复情况及抗病毒治疗的潜在效果[100-101]。

1. 沙粒病毒科 考虑到拉沙病毒基因组间变异较大，在设计诊断不同地区感染的引物时要特别小心[102-106]。为弥补该问题，可针对S RNA的5′端区域设计引物[107]，该方法已在尼日利亚Irrua专家教学医院大量患者中常规应用[108]。在资源贫乏地区，实时PCR方法可减少PCR污染概率[Irrua资料，13/1650份样本，(0.8%)]，但该方法仍缺少现场资料验证[108]。同样，各种RT-PCR技术也用于各种临床样本中Junin病毒的检测[20,103-104,109]。一些方法远比传统的病毒分离敏感性高，特别是出现相应的抗体时。任何替代在BSL4条件下进行的检测方法都应认真评估。然而，病毒分离和保存有很多优势，这项技术不应被放弃。即使病原已经鉴定的情况下，也应鼓励将临床样本运送到适当的参考实验室。

2. 丝状病毒科 能够最大程度检测丝状病毒的操作规程一般是基于*N*、*VP40*、*VP35*或*L*基因的内部保守序列，而要精确区分和进行进化分析是基于变异较大的GP区[2,34,110-111]。RT-PCR检测各种埃博拉病毒属的敏感性与传统的病毒分离相似。乌干达古卢SUDV暴发时，巢式RT-PCR方法体现了非常高的使用价值，因为该方法比其他方法鉴定早期感染患者的能力更强，而且也可检测恢复早期的患者样本，而此时患者体内已没有可检测到的抗原了。基于核蛋白的实时定量RT-PCR发现病毒载量和疾病的结局呈正相关[40,112]。2005年安哥拉及2012年乌干达马尔堡出血热暴发时，建立了马尔堡病毒的实时PCR检测方法，该方法在罗安达(安哥拉首都)和恩德培(乌干达南部城市)的实验室，并在Uige和Kabale现场得到有效的应用[43,51,113]。还有其他一些检测平台也可使用[111,114-115]，逆转录-环介导的等温扩增方法也已被报道[116-118]。西非埃博拉暴发时，大量针对*NP*、*VP40*和*GP*基因的核酸扩增方法被用于西非的现场检测及在欧洲和美国使用[119-121]。美国FDA批准了超过10个以上埃博拉病毒紧急使用授权(EUA)方法，包括BioFire和GeneXpert系统(表99-2)[119-120,122-125]。然而，大部分西非的临床标本还是用实时RT-PCR检测的，包括在塞拉利昂博城的CDC实验室在内，该实验室在15个月的运行期间检测了超过27 000份标本[126]。

六、分离程序

(一)细胞培养

大部分沙粒病毒和丝状病毒在细胞培养时生长良好。然而，由于设施要求(病毒培养不能在BSL2实验室进行)，细胞培养不建议作为临床诊断使用。临床样本和处理过的组织匀浆以适当的维持培养基稀释后，少量吸附在合适培养瓶中生长的单层细胞，如T-25组织培养瓶。如果14天时，通过间接免疫荧光法还未检测到病毒抗原，该样本考虑是阴性，但上清应盲传以证实没有病毒。如需证实出现病毒并对病毒进行鉴定，要通过细胞的免疫荧光实验和上清液抗原捕获酶联免疫吸附法或RT-PCR技术进行测试。

1. 沙粒病毒科 以Hypaque-Ficoll液分离的外周血白细胞与敏感细胞共培养提高了Junin病毒的分离率。实验室感染动物的脾脏淋巴细胞共培养可以从恢复后期动物中分离到拉沙病毒，甚至在动物已产生中和抗体时还可分离到沙拉病毒。该

表 99-2 基于核酸扩增检测埃博拉病毒的紧急使用授权(EUA)装置[a]

装置名	实验室	EUA 授权时间	标本类型	原则和方法	仪器	靶标	应用
EZ1 实时 RT-PCR 方法	美国国防部	2014 年 8 月 5 日	失活的全血或血浆	实时 PCR(TaqMan)	ABI 7500 FAST DX，JBAIDS 或 Roche LightCycler	扎伊尔型埃博拉病毒	感染地区有埃博拉病毒感染症状和体征的人，或有暴露风险，或已暴露于扎伊尔型埃博拉病毒并具有流行病学风险因子
埃博拉病毒 NP/VP40 实时 RT-PCR 方法[119,122]	美国疾控中心	2014 年 10 月 10 日	全血、血清和血浆	实时 RT-PCR，NP 或 VP40 靶标	ABI 7500 FAST DX，后扩展到伯乐 CFX96 Touch 实时 PCR	扎伊尔型埃博拉病毒	感染地区有埃博拉病毒感染症状和体征，和(或)具有流行病学风险因子的人
FilmArray Biothreat-E/NGDS BT-E[120,123,124]	BioFire Defense	2014 年 10 月 25 日	全血，尿	巢式 PCR 联合固相芯片	FilmArray 仪器	扎伊尔型埃博拉病毒	有埃博拉病毒感染症状和体征及具有流行病学风险因子的人
RealStar 埃博拉病毒 RT-PCR 试剂盒 1.0[125]	Altona Diagnostics	2014 年 11 月 10 日	EDTA 血浆	实时 PCR(TaqMan)	ABI 7500 SDS，ABI 7500 FAST SDS，LightCycler 480 Ⅱ，或 CFX96 system/Dx 实时系统	埃博拉病毒包括扎伊尔型	有埃博拉病毒感染症状和体征及具有流行病学风险因子的人
LightMix 埃博拉扎伊尔 rRT-PCR 检测	罗氏分子系统公司	2014 年 12 月 23 日	全血	实时 PCR(双杂交)	LightCycler 及 Cobas z 480 分析仪	扎伊尔型埃博拉病毒	有埃博拉病毒感染症状和体征的人
Xpert 埃博拉方法[119,122]	Cepheid	2015 年 3 月 23 日	EDTA 静脉全血	实时 PCR(TaqMan)	GeneXpert 装置	扎伊尔型埃博拉病毒	有埃博拉病毒感染症状和体征及具有流行病学风险因子的人
Idylla 埃博拉病毒分类检测	比利时 Biocartis NV	2015 年 5 月 26 日	EDTA 静脉全血	实时 PCR(TaqMan)	Idylla 系统	扎伊尔型埃博拉病毒	有埃博拉病毒感染症状和体征及具有流行病学风险因子的人

注：[a] 根据以下网址修订 https://www.fda.gov/MedicalDevices/Safety/EmergencySituations/ucm161496.htm

技术也用于其他沙粒病毒和丝状病毒的分离。适当的细胞培养系统，如 Vero E6 细胞是分离 LCM 病毒所需要的。LCM 病毒能够在细胞中生长到高滴度而引起非常小或不引起细胞病变。

尽管历史上，马丘波和 Junin 病毒分别通过接种新生仓鼠和小鼠分离，然而，Vero E6 细胞培养分离技术具有同样的敏感性，而且在处理 BSL4 实验室污染时也会省去很多麻烦。重要的是，Vero 细胞分离并鉴定病毒仅需 1～5 天，而动物从接种到出现疾病需要 7～20 天，这比动物实验要有优势[1]。

2. 丝状病毒科 目前，分离丝状病毒最佳的方法是接种适合的细胞（通常用 Vero 细胞），然后，间隔一段时间以间接免疫荧光法或其他免疫学特异的或核酸特异的方法检测接种细胞中病毒抗原、基因组 RNA 出现与否。其他细胞系包括人二倍体肺细胞（MRC-5）和 BHK-21 也可用于分离。MA-104（一种恒河猴胎肾细胞系）对一些毒株的分离敏感性要比 Vero 细胞高[2]。

（二）动物接种

1. 沙粒病毒科 颅内接种刚断奶的小鼠还是被认为是分离 LCM 病毒的最敏感方法[127]。应注意使用不含 LCM 病毒的小鼠种系。许多 LCM 病毒分离株在接种后 5～7 天诱发特征性的抽搐，这一现象具有确诊意义。死亡小鼠的脑组织可用作制备酶联免疫吸附法实验的抗原，也可用作更有说服力的间接免疫荧光法或免疫组织化学染色以鉴定病毒。已确诊的鼠脑也可用于中和试验或 RT-PCR 验证实验的病毒抗原。

大部分 LCM 病毒株也可引起豚鼠死亡。颅内接种拉沙病毒株对远交系 Swiss albino 小鼠的致病性随着毒株来源的不同而不一样。小鼠不应作为拉沙病毒分离用的动物。13/N 豚鼠接种 Lujo 病毒后出现出血性疾病[128]。对于新世界沙粒病毒，特别是 Junin 病毒，通常应用年轻的豚鼠颅内接种或外周接种法。豚鼠在 Junin 病毒接种后 7～18 天死亡。13/N 豚鼠对大部分沙粒病毒株相当敏感，一般在接种后 12～18 天死亡，而远交系的 Hartley 豚鼠敏感性要差些。新生小鼠（1～3 天龄）对 Junin 病毒颅内接种非常敏感。新生仓鼠对马丘波病毒更敏感。

2. 丝状病毒科 豚鼠接种马尔堡病毒、埃博拉病毒和 SUDV 后 4～10 天出现发热。然而，初次接种这些病毒动物都没有死亡，并且接种埃博拉病毒和马尔堡病毒会导致豚鼠死亡。新生小鼠颅内接种埃博拉病毒可引起发病，但 SUDV、RESTV 和马尔堡病毒通常不致病。最近，SCID 小鼠被成功用于西非埃博拉暴发时临床标本包括精液的 EBOV 分离[129]。

七、病毒鉴定

（一）分型抗血清

如果血清学试剂在实验室经测试后与已知所有的参考沙粒病毒和丝状病毒均可反应，在感染的培养细胞（一般是 Vero 或 MA-104 细胞）中检测出病毒抗原可以做出初步诊断。各种血清学测试中，细胞培养或组织匀浆中的病毒分离物与诊断血清发生反应可做出初步或特异性鉴定。多克隆抗血清可通过成年豚鼠、仓鼠、兔、大小鼠腹腔内接种感染的病毒制备。实验感染的恢复期恒河猴和猕猴也是制备大量抗血清的来源。通过免疫同一家族内多种病毒制备的多价多克隆分型血清或腹水也可用于病毒分离株的早期鉴定及不明原因患者样本的免疫组织化学鉴定。单次注射感染性的病毒制备的诊断血清交叉反应低，而且滴度一般也比多次注射灭活病毒的高。为进一步减少外源性抗体，免疫接种的病毒应采用与免疫动物相同种属的组织或细胞培养，或者病毒悬液应与同源性血清或血清蛋白混合。用于间接免疫荧光法和酶联免疫吸附法实验的血清应该在接种后 30～60 天收集，中和试验用血清应在更晚期收集。在出 BSL4 实验室之前，所有血清必须经过失活处理并严格进行活病毒的检测。

正如识别丝状病毒不同蛋白的单克隆抗体一样，通常使用识别 LCM 病毒、拉沙病毒、Junin 病毒[130-131]和其他沙粒病毒 N 和 GP 蛋白表位的高特异性小鼠单克隆抗体。除了特定的实验室外，这些病毒的参考试剂尚未普遍使用。

（二）免疫荧光

为进行感染细胞的 IFA 检测并初步鉴定，接种的细胞单层通过玻璃珠或细胞橡胶刮板或胰酶消化，洗涤后滴加于环氧树脂包被玻片上的圆形区域。这些“点状涂片”经空气干燥、丙酮室温固

定 10 min，用于快速染色或冻于 -70℃。尽管丙酮固定大量减少了细胞内感染性病毒的数量，以这种方式制备的点状涂片也应视为感染性的，须按照相应的保护措施操作。伽马射线已被用于点状涂片的灭活[31]，而且没有降低荧光抗原的强度。感染细胞也可用 β-丙内酯灭活[30]。如果有适合的设备，推荐使用伽马射线照射。

进行直接 FA 检测时，使用特异的荧光标记抗体并用伊文蓝复染。特异的病毒荧光呈致密针尖或小点状聚集分布在感染细胞质内。马尔堡病毒和埃博拉病毒特异性荧光还可呈大的、形态奇特的聚集物、直径达 10 μm。此类病毒的间接免疫荧光法检测，非特异荧光问题不明显。尽管拉沙病毒与 LCM 病毒有低水平的交叉反应，但用间接免疫荧光法检测出马尔堡、埃博拉、拉沙和 LCM 病毒抗原一般就可以确诊[132]。间接免疫荧光法检测出 Junin 或马丘波病毒抗原可进行初步诊断，对这 2 种病毒的区分仅仅依赖于中和试验或测序。间接免疫荧光法方法费时费力而且易出现交叉反应，但在无特异荧光标记抗体时仍可使用。不同显色方式的免疫组织化学技术也可用于沙拉病毒[84]和丝状病毒[85-86]的检测。最近报道了一种可检测和分型丝状病毒的多重核酸悬浮芯片方法[133]。

八、血清学试验

(一)间接免疫荧光法

直到 20 世纪 90 年代，间接免疫荧光法才被广泛用做检测丝状病毒新发感染或大规模研究[134]。感染 Vero 细胞点状涂片的制备如前所述。通过一些改进措施如改变点状涂片中细胞点的多少可增强试验的重复性、提高试验质量[135]。常用的是由单一病毒感染细胞制备的单价点状涂片，也可使用混合不同感染细胞的多价点状涂片，这些病毒可来自相似地域分布的相同或不同病毒[136]。使用表达重组抗原的细胞可避免制备点状涂片时需要在 BSL4 实验室操作的要求[137]。不同实验室间甚至不同的研究人员在滴度测定上的差异是十分普遍的现象。另外，大部分严重和死亡病例，患者在可能还没产生体液免疫反应或可检测到的抗体时就已死亡。这种情况下，该技术就不能用作 HF 的诊断。

(二)酶联免疫吸附法检测 IgG 和 IgM 抗体

无论出于何种目的，IgG 和 IgM 酶联免疫吸附法已经取代主观性较强的间接免疫荧光法并已成为血清学试验方法的首选[90,132]。已经成功建立了拉沙病毒特异的酶联免疫吸附法，并用于现场采集患者血清的检测[88,92]。当此抗体酶联免疫吸附法技术与上述的抗原捕获酶联免疫吸附法联合使用时，几乎所有的拉沙热患者都可在入院后数小时内做出特异性诊断。简单来说，以感染的 Vero 细胞裂解物为抗原，以磷酸盐缓冲液稀释后吸附于微量反应板，用于埃博拉感染检测[89,90,138]。同时也用于马尔堡病毒和 LCM 病毒。待检血清以 1∶100 起始系列倍比稀释，与抗原孵育，方法与上述抗原捕获酶联免疫吸附法相同。孵育后洗涤，加入触酶偶联的抗人抗体，以 ABTS 底物显色。流行病学研究中可用属特异的抗体检测不同种属动物的抗体。为避免流行病学研究中使用几个不同偶联抗体的情况，常使用蛋白 A-G 偶联抗体。最近建立了一种利用抗体相指示剂的竞争试验，但该技术还没在现场应用[114]。以 410 nm 测定的光密度值超过正常血清对照 3 个标准差为阳性。以抗人 IgM 包被反应板，测定血清稀释液和细胞裂解液，再采用抗原捕获方法可进行病毒特异性 IgM 的检测。IgG 和 IgM 酶联免疫吸附法也可用于自然感染的人样本和实验感染的拉沙、马丘波、Junin 和丝状病毒样本的检测。西非埃博拉病毒病暴发期间开发了种基于重组蛋白的检测方法，但都存在非特异反应的问题。已有报道一种用于 RESTV 检测的可替代酶联免疫吸附法反应板的滤膜简易试验[139]，该方法敏感性和准确性不如其他方法，但可用于现场检测。所有这些建立的方法都在不断改进以保证现场检测使用。已有研究者提出使用重组的完整或截短蛋白作为酶联免疫吸附法试验的抗原[140-142]。

(三)中和试验

对于沙粒病毒通常采用噬斑减少试验。拉沙病毒和 LCM 病毒的中和作用弱并且本身诱导的中和抗体很低，进行中和试验评价中和抗体水平时待检血清的稀释度一般为 1∶10，稀释液中含 10% 的豚鼠血清作为补体来源，稀释后的血清与系列稀释的病毒混合。以 $\log_{10}$ 中和指数作为中

和抗体滴度，数值为对照 $\log_{10}$ PFU 待检血清的 $\log_{10}$ PFU。进行 Junin 和马丘波病毒中和抗体测定时常采用恒定的血清-病毒稀释度，这种稀释方式也可用于毒株的鉴定。中和抗体的产生需要数周到数月时间，但可以持续数年。此项试验须严格在有处理感染性病毒能力的特定实验室进行。

拉沙病毒感染幸存者的中和抗体在恢复期末(6 周或更晚)出现，远远晚于病毒血症消失。其早期间接免疫荧光法抗体和后期中和抗体反应类型同 LCM 病毒感染相似。Junin 和马丘波病毒的中和抗体在发病后 3～4 周出现，紧接着病毒血症的结束而出现。这些抗体对于防止再次感染十分重要，但在缓解急性感染中的作用还不明确[68,143]。

如上所述，目前还没有可靠的评价丝状病毒中和抗体水平的方法。

(四)免疫印迹法

免疫印迹法可用于沙拉病毒和丝状病毒抗体的检测。然而，免疫印迹法被认为是补充间接免疫荧光法进行丝状病毒检测的验证性试验手段，尚未常规性应用于病毒诊断[135]。检测出核衣壳条带(N)及 VP30 或 VP24 条带之一可进行诊断。采用 Phast 系统的十二烷基磺酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳和电转设备(Phast Western blot 系统)，使免疫印迹法技术进一步改善。该技术尚未用于常规的抗体检测。

(五)其他血清学试验

其他一些血清学试验也被用于诊断，但大部分已不再使用。凝胶扩散试验曾用于沙粒病毒的检测，补体结合试验，反向被动血凝(及血凝抑制)试验利用拉沙病毒抗体偶联的红细胞，而 ^{125}I 标记的葡萄球菌 A 蛋白放射免疫技术可用于埃博拉的检测。免疫印迹法和放射免疫技术在特定的实验室可用于单克隆抗体特异性的检测，偶尔也用于验证血清酶联免疫吸附法阳性检测结果[142]。

九、抗病毒药物敏感性

目前，抗沙粒病毒的治疗仅局限于利巴韦林的适应证外使用，而且尚无病毒对利巴韦林的抗药性突变的报道。LCM 病毒在存在 KP-146 情况下持续传代没有出现导致对 KP-146 抗药性提高的变异[67]。目前还没有治疗丝状病毒的商品化药物，在临床实验中也没报道与病毒抗药性提高的突变[69-71]。

十、结果的评价、解释和报告

早期诊断沙粒病毒和丝状病毒很有意义，因为发病后立即使用特异的免疫血清和适当的抗病毒药物往往十分有效。感染早期的诊断有助于进行有效的隔离，防止疾病扩散。在疾病流行区，患病的可疑指数通常很高，有经验的临床医生可仅根据临床资料准确地进行诊断。然而，即使在这些地区，也要通过特异的病毒学和血清学试验来证实临床诊断，因为其他疾病包括疟疾、伤寒、立克次体感染、特发性血小板减少症及病毒性肝炎都可能被当作沙粒病毒或丝状病毒感染。在那些疏散可疑(或确诊)病例或近期出现症状的旅行者的国家，最好选择基于 RT-PCR 或实时 PCR 方法的检测[106-107,119-121]。

由于这类疾病的大部分严重和死亡病例在抗体产生之前就已死亡，需要进行现场检测 RNA、感染性病毒或抗原才能及时诊断。由于前面讨论的原因，基于靶向病毒 RNA 的 RT-PCR 方法无疑是最敏感也是最为广泛使用的试验[100]。用于现场检测的快速抗原侧流检测方法对临床上含有高滴度病毒的血浆、血清、体液及组织检测很有前景[37,88-89,94-96,144]。但是，这些方法的敏感性有待提高以避免假阴性结果。

RT-PCR 试验的使用减少了对明确诊断而进行感染性病毒分离的需要，但病毒分离对后续的遗传和致病性研究仍然非常重要。从感染组织甚至福尔马林固定组织中进行病毒基因组扩增，扩增产物进行测序已逐渐代替血清学方法进行沙粒病毒[103-105]和丝状病毒[33,40]的鉴定和分类。除了 LCM 病毒可在低级别实验室操作外，这类病毒的分离工作应在 BSL4 试验室进行[78]。对于任何临床可疑的出血热病例，建议联合这几种实验室技术来确证。

沙粒病毒感染中，拉沙病毒通常可以在刚入院的住院患者急性期血清中检测到(病毒分离、抗原检测及 RT-PCR 方法)，此时通常也有特异性 IgM 抗体存在，出现可检测水平的抗体并不代表

疾病开始恢复，病毒血症可持续存在。尽管出现了抗体，有些患者还是死亡了。Junin、马丘波及LCM病毒分离率很低，诊断多依赖于疾病晚期特异抗体的检测。LCM患者脑脊液以酶联免疫吸附法技术检测出特异的IgM抗体即可明确诊断，对所有的沙粒病毒而言，出现特异的IgM抗体表明有近期感染。目前尚未系统评估现有血清学试验试剂对不同沙粒病毒感染和(或)再感染造成的抗体特异性的影响。沙粒病毒的中和抗体可长期甚至终身存在，因此，可作为研究人群对再次感染最低抵抗力的最佳指标。中和抗体在急性恢复中的作用尚不清楚。被动输入免疫血浆被认为与中和抗体滴度有关，血浆筛选应以此为基础，这点特别对Junin和拉沙热尤为重要[68,143]。

对于丝状病毒而言，联合使用RT-PCR、抗原检测及IgM检测对急性病例的诊断是非常有价值的技术。FDA公布了超过10个EUAs授权使用核酸扩增和快速抗原检测的方法[94-96, 119-120, 122-125]。因为病毒培养需要时间及考虑生物安全，这类病毒的分离资料通常只能通过回顾性调查得到。马尔堡和埃博拉病毒通常很容易从急性期血清样本中分离到。IgM或IgG酶联免疫吸附法抗体滴度的升高即可进行初步诊断。由于IgM抗体滴度持续时间不长，因此，滴度的下降表明可能在数月前曾有病毒感染。一般来说，IgM或IgG抗体对埃博拉病毒的同源抗原有较强的反应。因为IgM酶联免疫吸附法对异源抗原的敏感性较差，使用IgM酶联免疫吸附法鉴定病毒属有一定的限制。不同的是，IgG抗体对异源抗体的交叉反应较强[145]。

今后检测方法发展的重点在于优化现有的诊断手段，能够在现场、床边或前沿诊所进行确诊和病毒鉴定。基于PCR的检测方法能够使现场实验室实时地诊断急性疾病。适当的引物设计可满足不同程度的特异性PCR的需要。过去10年新出现的沙粒病毒及BDBV提示人们仍需要有广谱能力的群特异性检测试剂，还需要继续制备和优化基于基因序列的实时PCR和基于特异性单克隆抗体的酶联免疫吸附法技术。

快速诊断技术的使用可以带来及时的公共卫生干预措施及治疗措施的介入。采取适当的感染控制措施已经极大地减少了这类高危险的病毒性传染病的传播和扩散。

参考文献请扫二维码查阅

第12篇

DNA病毒

第100章　单纯疱疹病毒和乙型疱疹病毒

ALEXANDER L. GRENINGER, RHODA ASHLEY MORROW, KEITH R. JEROME

（陶传敏　译；徐修礼、汤一苇　审校）

一、分类学

单纯疱疹病毒(herpes simplex virus, HSV)1型和2型是疱疹病毒科家族成员，分别正式命名为人疱疹病毒1型和人疱疹病毒2型。它们同水痘-带状疱疹病毒(varicella-zoster virus, VZV)(人疱疹病毒3型)和一些主要感染非人类宿主的病毒一道组成α疱疹病毒亚科。

二、病原体描述

人们认为疱疹病毒可与它们的宿主共同进化[1-2]，因此，最早推测有关HSV感染的记录出现在有文字和临床观察发展之后不久。HSV的感染特性在1919年得到证实[3]。在20世纪30年代，提出了血清学阳性和复发的概念[4-5]。在20世纪60年代，鉴定出抗原性不同的毒株(HSV-1和HSV-2)。HSV-1和HSV-2是9种已知的人疱疹病毒中的2种。此外，乙型疱疹病毒("猿猴疱疹病毒")，一种感染猕猴的疱疹病毒，在人类中是一种罕见但重要的人畜共患病原体。

HSV拥有线性双链基因组，HSV-1基因组长度为152 kbp，HSV-2为155 kbp。HSV-1和HSV-2在蛋白质编码区域内拥有83%同源的核苷酸序列。基因组由独特的长区域和独特的短区域构成，两侧是反向重复区。尽管重要序列在不相关的临床分离株间是保守的，毒株的鉴定可以通过测序、PCR或限制性内切酶消化分析完成。

HSV病毒体直径为120～300 nm，拥有一个含有DNA的中心电子致密核心，一个包绕核心的由162个壳粒组成的20面体衣壳，以及一层刺突包膜包绕的被膜，刺突包膜含有病毒糖蛋白，有助于病毒吸附、穿入和免疫逃逸。包膜为3层富含脂质膜，其主要来源于被感染细胞的核膜。由于病毒包膜富含脂质，因此很容易被灭活。脂溶剂，如70%乙醇或异丙醇(但不是>95%乙醇)、来苏儿(煤酚皂溶液)、bleach(含氯消毒剂)，以及暴露于pH<5或pH>11、或温度>56℃中30 min都会消除其传染性[6-7]。

病毒通过细胞类型依赖的宿主受体吸附于靶细胞开始复制[8-9]。在吸附后，病毒的包膜和细胞膜融合，释放衣壳进入细胞。衣壳转位至核孔[10-11]，并将DNA释放入细胞核。被膜蛋白VP16诱导即刻早期蛋白(或α蛋白)的表达，该蛋白反式激活早期基因(或β基因)的表达。早期基因在感染后5～7 h达到最大表达，它参与子代病毒DNA的合成。DNA复制需要晚期基因(或γ基因)的最佳合成，该基因编码主要的结构蛋白。在细胞核中，子代DNA被加工和组装到预先成型的衣壳中。包含DNA的衣壳吸附于含有病毒被膜蛋白和糖蛋白的核膜碎片上。在感觉神经节的神经元内，病毒形成了潜伏状态，游离的HSV DNA会在被感染个体的体内终身存在。当病毒再激活时，核衣壳被顺行运输到轴突末端，在这里完成有包膜病毒的最后组装[12]，通常会伴有周围上皮细胞的感染。在上皮细胞内病毒的完整复制周期约为20 h。

固有免疫机制，如巨噬细胞的激活、NK细胞和干扰素的产生，在原发感染的控制中起着主要作用，而固有免疫和获得性免疫在复发的控制中都是重要的。虽然认为细胞免疫和体液免疫都是重要的，细胞免疫缺陷患者常常表现出严重的HSV感染，而那些无丙种球蛋白血症的患者却不会出现严重感染[13]。在病变进展早期皮肤黏膜出

现 $CD4^+$ T 细胞浸润[14]，随后出现细胞毒性 T 淋巴细胞浸润[15]。HSV 特异性 T 细胞在病变进展早期即可检测到，在康复后也一直持续存在于病变部位[16-17]。T 细胞在控制背根神经节中的病毒再激活上起着重要的作用，该控制过程通过非细胞毒性的机制，不会导致神经元死亡[18]。

功能性抗体反应包括非补体依赖性和补体依赖性的病毒中和作用[19]。针对每一种病毒蛋白的 IgG、IgM、IgA 在感染后最初几周内出现[13]。IgM 在 2～3 个月后减弱，此后，约在 1/3 的复发性生殖器官疱疹患者中呈散发存在。抗体滴度在复发后可升高或不升高[20]。但是，IgG 滴度在原发感染后会持续数年。

病毒大多数表位(抗原决定簇)是 HSV-1 和 HSV-2 共有的，因此，很难区分 HSV-1 抗体和 HSV-2 抗体[21]。特别是在原本 HSV-1 血清学阳性的患者中，HSV-2 的血清学阳转伴随着对 HSV-1 的快速记忆反应，这就导致长时间的主要抗体反应直接针对 HSV-1 而不是 HSV-2[21]。尽管已证明型特异性的表位存在于主要的病毒蛋白上，但只有糖蛋白 G(gG)才能诱导主要的型特异性反应。

三、流行病学和传播

HSV 感染发生在世界各地，没有季节性。病毒是通过与分泌物中的病毒直接接触传播。潜伏期为 1～26 天。HSV-1 感染的患病率从童年开始逐渐增加，到晚年可达到 80%或更高[22]。相反，HSV-2 的血清学阳性率在青春期前和性行为开始之前保持低水平。1988－1994 年，美国 HSV-2 抗体的阳性率达到了 21%，但在 2005－2008 年，血清学阳性率下降至 16%[23]，2015－2016 年下降至 12%[24]。血清学阳性率变化很大，在部分统计的人群中超过 50%[25-26]。一般来说，美国 HSV-2 血清学阳性率比其他发达国家更高[27-28]。

大部分 HSV-1 和(或)HSV-2 血清学阳性的患者不知道自己已经被感染[26,29]。这些人构成了重要的感染来源。据报道通过安全套使用，生殖道 HSV 传播的风险减少 30%～50%[30,31]，近期一项对以前的研究数据进行的病例交叉分析显示传播风险的减少可能远远超过了以前的估计[32]。通过向性伴侣披露 HSV 感染的状况可降低约 50%的传播[33]，通过对有感染的性伴侣进行抑制性抗病毒治疗[34]，传播率也可减少约 50%。这些方法的联合能进一步降低传播风险。

今后对 HSV-1 和 HSV-2 的流行病学和传播的研究随着这些病毒的基因组序列数据的不断增加将会更加丰富。截至 2017 年年中，NCBI 中的 *HSV-1* 和 *HSV-2* 基因组数据各约有 150 个，比过去 4 年增加 10 倍以上。由于基因中 GC 含量过高(70%)，存在许多重复片段，以及需要从人类 DNA 中富集。早期对 *HSV* 基因组进化和多样性的研究强调测序病毒间总体有限多样性、型间重组(HSV-1×HSV-2)和型内重组(HSV-1×HSV-1)发挥的作用，以及均聚物移码突变的高负担等导致 *HSV-1* 和 *HSV-2* 的基因组测序困难[35-36]。事实上，迄今为止大多数的 HSV-2 序列包含 HSV-1 序列[37-38]。新的方法允许从临床标本直接测序，而不像以前需要培养分离物[38]。关于 *HSV-1* 和 *HSV-2* 基因组在传播链和全球多样性中的进化，特别是在撒哈拉以南非洲，还有许多悬而未决的问题值得关注。

四、临床意义

(一)原发感染

多数 HSV-1 感染是早在儿童期获得，表现为亚临床或未确认的感染。幼儿可能表现为典型原发 HSV-1 感染，以龈口炎、发热和标志性的颌下淋巴结肿大为特征。口腔损伤可进展为溃疡，在 2～3 周后可自愈而不留瘢痕。青少年可表现为咽炎和单核细胞增多症。

HSV-2 原发感染典型表现为生殖器疱疹，伴有广泛性的双侧水疱、发热、腹股沟淋巴结肿大和排尿困难。病损形成的溃疡在 3 周内自愈且不留瘢痕。继发性损伤可在第 2～3 周出现。亚临床或未确认的 HSV-2 原发感染常见。

由 HSV-1 导致的原发性生殖器感染的比例正在增加[39]，从 1983 年的 10%左右增至 1995 年的 32%[40-41]，如今，至少在某些人群中成为首发肛门-生殖器感染的主要原因[42-44]。在一项对 18～30 岁年轻女性的大型研究中，HSV-1 引起的原发感染超过 HSV-2 的 2 倍[44]，对于临床可辨识的原发性 HSV-1 感染，75%以上是生殖器感染而不是口腔感染。这种趋势被认为是由于性行为的改变

所致，包括增加的口腔-生殖器暴露[42]。原发性生殖器 HSV-1 感染的临床表现不能与 HSV-2 感染相区分。然而，由生殖器 HSV-1 引起的复发性疾病（见下文）比 HSV-2 更不常见[40,45]。因此，明确感染病毒的型别可用于疾病的预后判断。

(二)潜伏和复发性疾病

HSV-1 或 HSV-2 的原发性感染发生于其在感觉神经节内潜伏后，典型地表现为与三叉神经节相应的口唇疾病和与腰骶背根神经节相应的生殖器疾病。病毒周期性地再激活，通过神经轴突运行到口腔或生殖器部位，导致感染性病毒的释放，在某些病例中形成损伤。复发感染比原发感染症状轻，损伤自愈时间更短[40,46]。HSV-2 生殖器疱疹复发频率在个体间变化很大，每年 0～12 次或更多[47]，平均每月发作 0.33 次。口唇 HSV-1 感染复发率更低，平均每月发作 0.12 次，而生殖器 HSV-1 感染复发率甚至更低（平均每月发作 0.02 次）[48]。尽管在原发性生殖器疱疹感染发作期间，可以从咽部分离到 HSV-2，但口唇 HSV-2 感染复发极为少见[48]。

(三)无症状或亚临床感染

70%～90%具有 HSV-2 抗体的个体未被诊断为生殖器疱疹[26,29]。在接受关于 HSV 疾病表现的教育后，这些人中超过一半认识到自己曾出现过症状[49-50]。此外，约 20%出现生殖器疱疹首次发作的患者有血清学证据显示他们已经感染一段时间[51]。这些发作症状相对较轻，和复发性疾病很相似。在真正的原发患者和首次确认复发患者之间，复发的风险是相似的[20]。大多数生殖器疱疹患者可发生肛门生殖道亚临床排毒，这构成了一个重要的传染源。HSV DNA 的拷贝数有时在亚临床发作时可以和症状出现时一样高[52]。一般来讲，HSV-1 的口腔排毒不像 HSV-2 生殖器排毒那样常见[53]。HSV-2 口腔排毒或 HSV-1 生殖器排毒是相对少见的，特别是在非新感染病例，这种情况更少见[48,53-54]。

(四)新生儿疱疹

生殖器 HSV 感染最严重的后果是新生儿疱疹。感染通常发生在阴道分娩期间，此时婴儿暴露于含有 HSV 的母体分泌物中。那些在分娩时未察觉的原发疱疹感染母亲的母婴传播风险，比那些因复发和亚临床再激活而排出 HSV 的母亲要高 10 倍。这一结论的部分依据来自于在 HSV 血清学阴性的母亲中新生儿感染率为 54/100 000，在仅有 HSV-1 抗体的母亲中为 26/100 000，在具有 HSV-2 抗体的所有母亲中为 22/100 000[55-56]。HSV-1 的传播率明显高于 HSV-2[56-57]。原发感染时的高传播率意味着在所有新生儿疱疹病例中，有 50%～80%发生在临产期生殖器 HSV 感染母亲的小孩[58-59]。因此，有 HSV 感染的孕妇应同时进行型特异性血清学试验和病毒分型以确定那些感染风险较高的婴儿[60]。

感染 HSV 的新生儿可能出现位于皮肤、眼部和黏膜或更严重的中枢神经系统（CNS）疾病，或播散性疾病，但通常没有特异性的表现[61-62]。未经治疗的播散性疾病的新生儿死亡率超过 70%。当疾病局限在皮肤时，早期诊断和抗病毒治疗能够大大减少新生儿感染的发病率和死亡率[63-64]。PCR 应该用于检测来自病损部位、其他黏膜部位、脑脊液（CSF）和血液样本[61,65-67]。虽然一直主张对（皮肤黏膜）浅表部位样本进行病毒培养[68]，但 PCR 方法具有对浅表样本检测的高敏感性已得到公认[52]。根据已建立的指南，在进行 HSV 检测之前，可以结合身体部位的拭子样本来判断[68]。

(五)免疫功能正常宿主的疱疹性中枢神经系统疾病

在美国，HSV 是致命的散发性脑炎最常见的原因[69]。HSV-1 与更多颞叶局灶性脑炎相关，而 HSV-2 与脑膜炎和轻度神经系统疾病相关[70]。HSV 脑炎因局部颞叶受累而表现为发热、行为改变和意识改变。未经治疗的患者死亡率超过 70%，少有幸存者可恢复正常神经功能。早期阿昔洛韦治疗能减少发病率和死亡率，但残余神经功能损伤较为常见[71]。CSF 的 HSV PCR 是首选检测方法，但不应作为治愈的评价试验[72-73]。CSF 病毒培养不能用于 HSV 脑炎的诊断。

生殖器 HSV 感染随后可能会并发散发性脑膜炎或复发性脑膜炎（莫拉雷综合征），后者以头痛、发热、畏光和淋巴细胞增多为特点[74-75]。这种疾病为自限性，通常在 1 周内就会恢复。HSV 可与脊髓炎、脊神经根炎、上行性麻痹、自主神经功能障碍有关，也可能与贝尔麻痹有关。

(六)住院成年患者的全身性 HSV 感染

有时能通过 PCR 方法在原发性 HSV 疾病[76]和复发性唇疱疹[77]患者血液中检测到 HSV。偶尔也能在免疫功能正常或免疫缺陷的住院成年患者的血液中检测到 HSV[78-79]。具有可被检测出 HSV 病毒血症的住院患者常有肝炎、发热、中枢神经系统病变、皮肤损害、腹痛或脓毒症等临床症状，虽然尚未确定 HSV 是导致这些症状的原因。然而，检测到 HSV 病毒血症的住院患者确实具有较高死亡率，提示病毒血症检测的作用。HSV 肝炎患者血浆中具有高病毒载量，这可能是 HSV 作为一种肝炎病因的首要指征，这种肝炎尽管可治疗，但通常是致命的[80]。

(七)眼部的疱疹感染

在美国，HSV 是引起角膜感染最常见的病毒性原因，受感染人数达 400 000～500 000 例[81-82]。大多数角膜 HSV 感染局限于上皮层，引起特征性的树枝状溃疡、疼痛、畏光和视物模糊。HSV 上皮性角膜炎对口服或局部治疗的反应性良好(见下文)。这种表浅感染能治愈而不会丧失视力。HSV 感染可扩展到角膜基质，导致瘢痕和角膜混浊。角膜基质 HSV 感染对类固醇与局部或口服抗病毒药物联合治疗的反应效果良好[83-84]。与 HSV-2 相比，眼部 HSV 感染更有可能是由 HSV-1 引起[85]。

(八)免疫功能不全宿主的疱疹

细胞免疫缺陷的免疫抑制个体经常发展为有症状性的 HSV 疾病。这些个体的 HSV 感染可能较严重，伴有广泛的皮肤黏膜坏死和毗邻组织受累所致食管炎或直肠炎。能导致脑膜脑炎、肺炎、肝炎和凝血功能障碍的播散性 HSV 感染，在免疫功能不全患者和住院患者中比普遍认为的更为常见[78,86]。播散性感染需要静脉抗病毒治疗和监测抗病毒耐药性的发展。

五、抗病毒治疗

阿昔洛韦(acyclovir)、伐昔洛韦(valacyclovir)、喷昔洛韦(penciclovir)和泛昔洛韦(famciclovir)等抗病毒药物现被广泛用于治疗皮肤黏膜和生殖器疱疹[87-88]及反复发作症状的长期抑制病例。这些药物被病毒胸苷激酶选择性激活，不良反应最小。抑制性治疗减少了 HSV 感染类型不一致性伴侣之间的病毒传播风险[34]。N-二十二烷醇是一种抑制病毒-宿主膜融合的非处方局部治疗药物，与局部阿昔洛韦用于唇疱疹的治疗。HSV 结膜炎、睑缘炎和树枝状角膜炎可以用三氟尿苷(trifluridine)、疱疹净(idoxuridine)或阿糖腺苷(vidarabine)局部治疗，或用阿昔洛韦、伐昔洛韦或泛昔洛韦口服治疗[83]。在基质受累时，局部加用皮质类固醇可减轻持续的炎症反应[83]。新生儿疱疹、疱疹性脑炎和免疫功能低下患者的严重感染需要及时应用静脉抗病毒治疗[89]。替代剂膦甲酸钠(foscarnet)、西多福韦(cidofovir)和阿糖腺苷通常用于阿昔洛韦耐药疱疹感染[88,90]。普利特(pritelivir)，一种新的靶向 HSV 解旋酶/引物酶复合物的化合物，可减少生殖器 HSV 的排出，在临床试验中已显示出疗效[91-93]，有可能在将来提供更多的治疗选择。

六、标本的采集、运输和储存

DNA 扩增(PCR)的样本需要小心地采集和处理，以确保足够的样本和避免外源性病毒 DNA 对样本的污染。对于病损或黏膜部位，专门的样本应该用 Dacron 拭子采集，并置于病毒运输培养基(viral transport medium，VTM)或消化缓冲液中[94]。血清、血浆和 CSF 不需要特殊处理。肝素能够抑制 PCR 反应，因此不适合作为抗凝剂。用于 PCR 的样本能在 4℃保存 72 h，但更长时间的储存应放在－20℃环境中[95-96]。

为进行病毒培养，病损或黏膜部位的样本应放在 VTM 中并且保持在受控的温度以保持最佳的感染力。VTM 是用平衡盐溶液，如 Hanks 平衡盐溶液、Stuart 培养基、Leibovitz-Emory 培养基、小牛肉浸液或胰蛋白磷酸盐肉汤缓冲液保持中性 pH。添加蛋白质稳定剂，如明胶或牛血清白蛋白及抗生素以阻止细菌过度生长[97]。大多数 VTM 不适于细菌和衣原体的运输。但是，Remel (Lenexa，KS)公司的 Multi-Microbe M4 培养基和 Copan(Murrieta，CA)公司的通用运输培养基适用于病毒、衣原体、支原体、脲原体。重要的是，实验室应该对所选用的培养基的适用性进行验证，

因为它们的性能在特定应用下可能会发生变化。

在采样前，应用棉拭子去除黏膜部位（子宫颈内膜、肛门-生殖器部位、结膜和咽喉）或病损部位的坏死碎片或渗出物。须用Dacron、人造纤维或铝柄棉拭子用力地摩擦以确保采集到病损底部的受感染细胞。藻酸钙拭子和木柄拭子会抑制病毒感染性和酶介导的DNA扩增反应（译者注：应避免使用这类拭子采样）[97-98]。然后，将拭子放置在VTM中运输。多家制造商提供拭子/培养基复合包装，如Copan通用运输培养基系统和Remel Multi-Microbe M4系统。

样本应该在冷（充足的冰袋）但非冷冻的环境中运送。长时间（>48 h）储存应该在−70℃环境中。与4℃相比，HSV稳定性在22℃明显降低。一项研究显示，在Copan CVM培养基中HSV病毒半衰期中位数在4℃为6.8天（HSV-1）和4.9天（HSV-2），但在22℃仅为1.9天（HSV-1）和3.8天（HSV-2）[99]。有报道显示，使用其他运输培养基，HSV-1半衰期变化范围为22℃下0.5～4.0天，4℃下1～180天[100]。

单个标本转输管可以提供病毒培养和直接抗原检测所需的样品。或者，在样本采集后，立即将拭子上的样本轻轻地在一块干净显微镜玻片上涂成薄层，制备成直接荧光抗体检测的涂片。在运输前要将涂片风干并用冷丙酮固定。

诸如气管抽吸物等液体应该无菌采集且运输时不需要VTM。尿应该用干净的容器采集并且在运输前要冷藏。一旦运送到实验室，尿要在细胞培养前用培养基进行1:1稀释。应用手术刀获得角膜标本，将细胞悬浮在VTM中。组织样本应该放在含有VTM的无菌容器中。组织样本的长期储存需要浸泡在无菌的50%中性甘油盐水中，或者放在5%胎牛血清的培养基中。新鲜组织标本也能冷冻、切片、制作涂片并用丙酮固定。

七、直接检测

不经过中间的培养扩增步骤而直接对患者样本中的病毒检测提供了最快速的诊断。PCR或其他DNA扩增技术提供了最灵敏的直接检测方法，并已成为许多实验室选择的方法。检测抗原的免疫染色方法比基于细胞病变效应（cytopathic effect，CPE）的培养方法需要的专业技能少，并且通常比培养分离或DNA扩增更便宜。

（一）DNA扩增

PCR或其他扩增方法是直接检测HSV的最敏感方法[101]，如CSF的检测，但近来PCR也被越来越多地用于肛门生殖道和其他类型样本。多年来，在美国，HSV的DNA扩增只作为实验室自建试验。然而在2010年，FDA批准了第一批多个基于DNA的HSV检测试验，这些FDA批准试验的出现加快了从培养到DNA检测的发展趋势。由于手工操作时间短、高敏感性（95%～100%）和高特异性（95%～100%），FDA批准的多种标本直接检测方法得到普及[102-107]。这些检测不需要DNA提取，结果可在大约1 h内获得，手工操作时间为2～5 min，并且显示很好的重现性[108]。并不是FDA批准的所有标本直接检测方法都能像实验室自建的或FDA批准的体外诊断实时PCR检测一样可提供定量结果。病毒定量可能有助于监测对抗病毒治疗的反应，特别是在HSV脑炎或新生儿疱疹感染中[109]。

无论是FDA批准的还是实验室自建的实验方法，在检测中小心防止样本污染和常规设置阴性质控都是至关重要的[110-111]。一些实验室在PCR扩增中使用异补骨脂素或尿嘧啶-N-糖基化酶以预防PCR产物在后续反应中的扩增。通过使用实时荧光定量PCR检测系统避免了对PCR产物扩增后的处理操作，减小了扩增产物对实验室污染的可能性。实施PCR检测的实验室应参加定期的能力验证计划，例如，由美国病理学家协会（www.cap.org）和分子诊断质量控制协会（www.qcmd.org）提供的能力验证计划。

根据靶基因和检测方法，PCR检测能设计用于同时检测HSV-1和HSV-2[94,112]，或区分HSV-1和HSV-2[94,113]。已有多个PCR引物被描述，用于扩增HSV部分基因，可编码胸苷激酶（U_L23）、DNA聚合酶（U_L30）、DNA结合蛋白（U_L42），以及糖蛋白B、C、D、G（分别为U_L27、U_L44、U_s6、U_s4）和其他蛋白。对HSV PCR检测而言，靶基因的选择可能不是一个关键因素，已经研发出利用多种靶基因的有效和敏感的检测试验。相反，实验室应确保所用的引物和探针在预期检测中遵循有效的PCR试验设计原则[114]。通过使用型特异性的引物和探针、熔解曲线分析、限

制性酶切分析或直接测序可以区别 HSV-1 和 HSV-2。理想情况下，应在初次 HSV 检测时提供病毒分型信息，以避免在提供适当预后、咨询和医疗管理时出现延误。

PCR 是 CSF、新生儿和眼部标本中进行 HSV 检测的金标准，并且越来越多地应用于其他样本类型。经实验室间比对，已报道其在检测性能上存在显著性差异，特别是低阳性标本检测的敏感性[115]。由样本到结果的检测平台对 CSF 中 HSV 检测的已发表的分析敏感性为每毫升 50～250 拷贝，尽管大多数试剂说明书报告分析敏感性用 50%(半数)组织培养感染剂量/毫升表示[116-117]。对 CSF 检测的敏感性没有达成共识，实验室间的差异由于目前缺乏对 HSV 的国际参考标准而加剧。因此，在选择 DNA 扩增试验的提供者之前，仔细考虑实验室或生产商的声誉、性能数据和测试周转时间很重要。

如上所述，尽管拥有欧洲共同体认证(CE)标识的检测在欧洲已经上市多年，FDA 批准的商品化 HSV 分子检测近期日渐增多(表 100-1)。EraGen Multi-Code-RTx HSV1&2 试剂盒是 FDA 在 2010 年批准的仅用于有症状的女性患者阴道病损拭子的 HSV 定性检测和分型试剂，现在能从 Luminex Corp 公司(Austin，TX)获得。该检测是基于一对合成的 isoC：isoG 碱基对的 PCR 扩增反应。它最初被批准用在 Roche MagNA Pure LC 仪器进行样本提取并在 Roche LightCycler 实时 PCR 仪(Basel，Switzerland)上进行扩增。随后 bioMérieux NucliSens easyMag 提取系统也被 FDA 批准用于样本提取。现在 Luminex 上市 ARIES 平台上用于 FDA 批准的定性 HSV-1 和 HSV-2 直接样本检测，然而，该检测还没被 FDA 批准用于 CSF。

表 100-1 FDA 批准的 HSV 的分子扩增试验

试验名称	制造商	扩增技术	批准的样本类型	定性或定量	能否进行 HSV 分型	仪器
Multi-Code-RTx HSV1&2 试剂盒	Luminex，Austin，TX	PCR	有症状女性患者的阴道病损拭子	定性	能	样本提取采用 Roche MagNA Pure LC 或者 bioMérieux NucliSens easyMag；扩增采用 Roche LightCycler
ProbeTec HSV(HSV1&2) Q^x 扩增 DNA 检测	BD，Franklin Lakes，NJ	链替代扩增反应	由临床医生采集的外生殖器病损标本	定性	能	BD Viper 系统的提取模式
AmpliVue HSV1+2 检测	Quidel，San Diego，CA	解螺旋酶依赖扩增反应	有症状患者的皮肤和黏膜病损标本	定性	能	单用手持式一次性检测装置
FilmArray 脑膜炎/脑炎检测	BioFire，Salt Lake City，UT	巢式实时 PCR	CSF	定性	能	样本到结果，一次性检测袋
Simplexa HSV1&2 直接试剂盒	Focus	PCR	CSF/拭子	定性	能	样本到结果，一次性检测盘
Aries HSV1&2 检测	Luminex，Austin，TX	实时 PCR	拭子	定性	能	样本到结果，一次性检测
Lyra Direct HSV1+2/VZV 检测	Quidel，San Diego，CA	实时 PCR	拭子	定性	能	提取；在各种实时热循环仪进行扩增
Solana HSV 1+2/VZV 检测	Quidel，San Diego，CA	解螺旋酶依赖扩增反应	有症状患者的皮肤和黏膜病损标本	定性	能	专用扩增/检测仪器
artus HSV-1/2 QS-RGQ MDx 试剂盒	Qiagen	实时 PCR	拭子	定性	能	Qiasymphony 提取，Rotor-Gene Q MDx 扩增
Cobas HSV1 和 2 试验	Roche，Switzerland	实时 PCR	拭子	定性	能	Cobas 4800 提取
Anyplex Ⅱ HSV-1/2 检测	Seegene，South Korea	实时 PCR	拭子，女性	定性	能	Qiagen 提取，Cepheid SmartCycler Ⅱ Dx 扩增
Sentosa SA201 HSV-1/2 PCR 试验	Vela，Fairfield，NJ	实时 PCR	男性或女性肛门与生殖器的或口腔的皮肤病损标本	定性	能	Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM 仪器

ProbeTecHSV(HSV1&2)Q^X扩增DNA检测(BD,Franklin Lakes,NJ)使用链替代扩增来定性检测和区分HSV-1和HSV-2,该检测使用全自动BD Viper系统在提取模式下进行,对2011年被FDA批准用于临床医生采集的肛门生殖器外部病变处标本进行检测。在一个大型的一对一比较研究中,该检测显示远比病毒分离培养敏感得多,与华盛顿大学PCR检测相比,其特异性和敏感性为95.1%~100%[118]。

IsoAmp HSV检测(BioHelix, Beverly, MA)已被FDA批准用于有症状患者的生殖器和口腔病损部位样本的HSV-1和HSV-2检测。IsoAmp HSV检测是依赖解螺旋酶的扩增技术和一种独特的单用手持式一次性检测装置,实现快速周转时间(1.5 h)。但该测试不能区分HSV-1和HSV-2。一项与病毒培养的比较显示,IsoAmp HSV检测的敏感性为100%,特异性为96.3%;对HSV-1和HSV-2的分析敏感性分别为5.5和34.1拷贝/反应[119]。在Quidel(San Diego, CA)收购BioHelix之后,等温解螺旋酶依赖扩增技术被整合到FDA批准的Quidel AmpliVue HSV 1+HSV2检测中,实现了HSV-1与HSV-2的鉴别。Quidel还提供经FDA批准的Lyra Direct HSV 1+2/VZV检测和Solana HSV 1+HSV2/VZV检测,前者为一种多重PCR测试,后者为一种基于多重解螺旋酶依赖的扩增技术的检测,两者均可检测并区分HSV-1、HSV-2和VZV。

FDA批准的其他快速由样本到结果的检测包括BioFire FilmArray脑膜炎/脑炎组合测试,以及Focus Simplexa HSV-1和HSV-2。其中,只有Simplexa被同时批准用于CSF和拭子标本。FilmArray能直接从CSF中检测14种病原体,包括HSV1/HSV2,对一项采集1560份CSF标本的前瞻性研究显示,该检测对16份HSV-1/2阳性标本的敏感性为100%[117]。值得注意的是,在研究中发现3份假阳性HSV-1/HSV2结果,该结果和其他相似的假阳性HSV结果被归因于分析前污染[120]。对100份CSF标本检测结果也显示,Simplexa检测的敏感性为96.2%(50/52),特异性为97.9%(47/48),对差异样本的进一步试验表明敏感性可达100%[105]。

(二)其他基于核酸的检测

原位杂交或液相杂交法的应用不如DNA扩增、间接荧光抗原法或直接荧光抗体法(direct fluorescent antibody assay,DFA)广泛。原位杂交或液相杂交法使用DNA或RNA探针,其中一些是型特异性的。直接杂交法的敏感性有限(约1×10^5拷贝/ml),因此,这些方法已经在很大程度上被PCR或其他扩增方法所取代。

(三)显微镜检查

HSV特征性的改变有时能够在取自病变(赞克制样法)或子宫颈刮片(巴氏染色)的固定染色的细胞中或固定组织的苏木素和伊红染色中看到[121]。增大或变性的细胞、合胞体形成、染色质边集、细胞质的“毛玻璃”外观和核内包涵体是HSV感染细胞的特征。这些方法被广泛使用,但是缺乏敏感性和特异性[122]。建议选择具有病毒特异性的方法。

(四)抗原检测

使用患者样本中的细胞制备涂片、固定,以及包被针对HSV-1和HSV-2,或针对两型共有表位的抗体制剂。一些制造商提供双重的抗HSV和抗VZV抗体的组合试剂。如果抗体连接到如异硫氰酸荧光素等荧光基团,即为DFA。如果结合到标本中的HSV抗体是通过与荧光基团结合的第二抗体来检测,则为间接荧光抗体试验。同一个标本孔可通过同时用标记了不同荧光基团的HSV-1和HSV-2抗体进行检测[123]。DFA敏感性为培养的10%~87%,水疱病损标本的敏感性稍高,来自愈合病损标本的敏感性较低[48]。DFA敏感性远低于PCR[124],尚无验证过的DFA商品试剂盒供应。细胞离心DFA的敏感性变化很大。一项研究显示,该方法检测拭子标本中HSV的敏感性比培养法更高[125],而另一研究使用不同的DFA抗体和细胞培养系统,所报道的敏感性是培养法的31%[126]。不同的样本类型,如眼部或黏膜拭子,在提供用于获得准确的DFA结果所需足够的细胞方面可能有较大的差异。据报道,Light Diagnostics Simulfluor检测(Millipore,Billerica,MA)与培养法相比其敏感性为80%,特异性为98.8%[123],与包括2种基于PCR检测在内的多种方法相比,敏感性为86.2%[127]。免疫组化技术已被描述用于检测组织中的HSV,但与培养和分子方法相比,其敏感性同样较低[128]。

八、病毒分离程序

尽管分子检测越来越受到青睐，病毒培养和改进式培养等检测方法仍在用于诊断皮肤黏膜、生殖器和眼部病变（表 100-2）。传统培养使用的细胞要能容许 HSV-1 和 HSV-2，以及其他可能具有重要诊断意义病毒的生长。接种了标本的细胞需频繁地观察 CPE（见下文）。在笔者实验室，95%的 HSV 分离株在第 5 天产生 CPE；只有 5%需要 5～14 天。已有商品化供应的水貂肺细胞、横纹肌肉瘤细胞、人二倍体成纤维细胞如 MRC-5 和 WI-38 和人表皮样癌细胞系如 HEp-2 和 A549。直接比较表明，病毒检测敏感性可能明显受到使用细胞的影响，特别是低滴度 HSV 接种物[129]。

感染细胞形成胞质颗粒，然后变大、变圆和具有折光性。在病毒接种人二倍体成纤维细胞或人表皮样癌细胞系后，感染细胞早期出现聚堆或“灶”状（图 100-1）。A549 细胞的 CPE 以合胞体形成为特征，特别见于 HSV-2[130]，然后细胞裂解，与培养基质分离，最终单细胞层破坏。其他数据显示，带有间接荧光抗原的细胞培养（如壳瓶培养法），或者工程化 β-半乳糖苷酶报告基团 DFA 法（ELVIS 系统）的细胞培养，可更灵敏和快速地进行基于培养的 HSV 分型，周转时间短至 1 天[131]。当需要检测阿昔洛韦耐药性时，培养仍然有帮助，而且它可能比分子方法更便宜，但相对于培养而言，PCR 的敏感性较高和操作时间较短，使得培养的总体应用受到限制。

表 100-2 选定的 HSV 诊断性试验

综合征	样本	检测方法	注释说明
口腔或生殖器病变	置于 VTM 中的拭子	培养，壳瓶法	必须保持标本中病毒活性
		DFA，细胞离心涂片 DFA	必须保持完整的细胞结构
		PCR	比培养更稳定
复发性生殖器症状；病毒分离培养阴性	血清	免疫印迹法	可用性有限；是很好的确证试验
	血清	gG 特异性的 ELISA	经 FDA 批准
	毛细血管血	基于 gG 的床旁检验	经 FDA 批准
	置于 VTM 中的拭子	PCR	比培养更敏感
新生儿疱疹	CSF；EDTA 抗凝血	PCR	采集单独的 CSF 进行 PCR 检测
	眼、口、鼻和直肠拭子	培养，DFA，PCR	EDTA 抗凝血（紫帽管）
眼部疱疹	置于 VTM 中的拭子	PCR，培养，DFA	临床表现可能足够作出诊断
结膜炎	角膜刮片	PCR，培养，DFA	
树枝状角膜溃疡			
脑炎	CSF、脑组织	PCR	不应该进行 CSF 培养
复发性淋巴细胞性脑膜炎	CSF	PCR	因培养敏感性远低于 PCR 的，所以不推荐

九、鉴定与分型

其他病毒及标本中的毒性因子能够模拟出 HSV 引起的 CPE（图 100-2a）。要确认假定的 HSV 相关 CPE，需通过商品化的针对型共同或型特异性表位的多克隆抗体或单克隆抗体来完成。最广泛使用的是荧光抗体试验中使用的荧光标记试剂（表 100-3）。快速离心扩增方法通过在 CPE 形成前检测病毒蛋白，减少了培养法检测 HSV 所需的时间[129]。使用最广泛的技术包括将样本离心到置于小瓶（壳瓶）底部的盖玻片或平底孔板的孔中的单层细胞内。经过 16～48 h 孵育后，盖玻片或孔板用于 HSV 抗原检测试验[123]。目前越来越多地采用分子方法进行分型和鉴定。上述所有样本直接检测（Luminex Aries，BioFire 脑膜炎/脑炎，Focus Simplexa）可在最初的 PCR 中区分 HSV-1 和 HSV-2，不需要额外试验来鉴别。

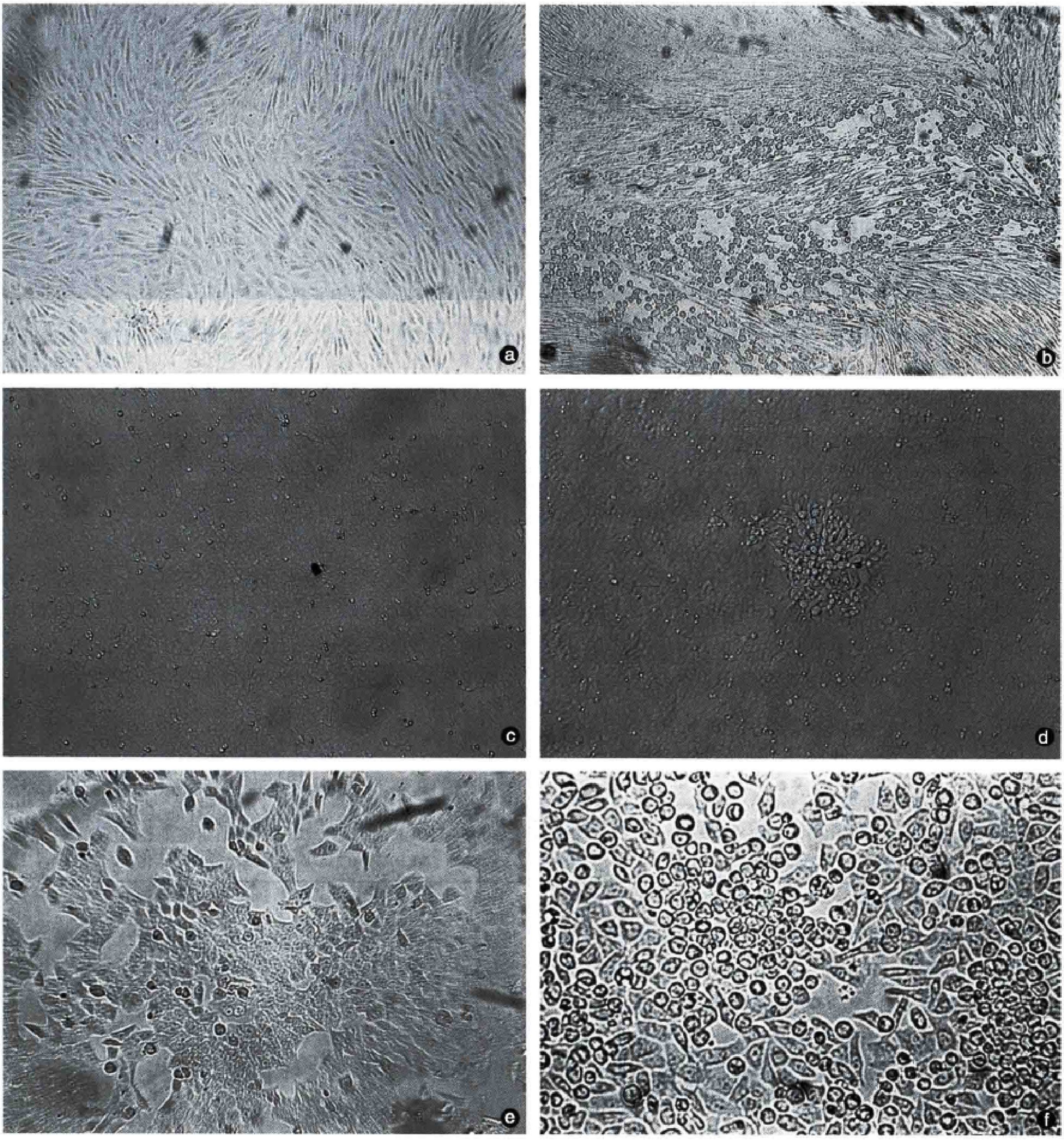
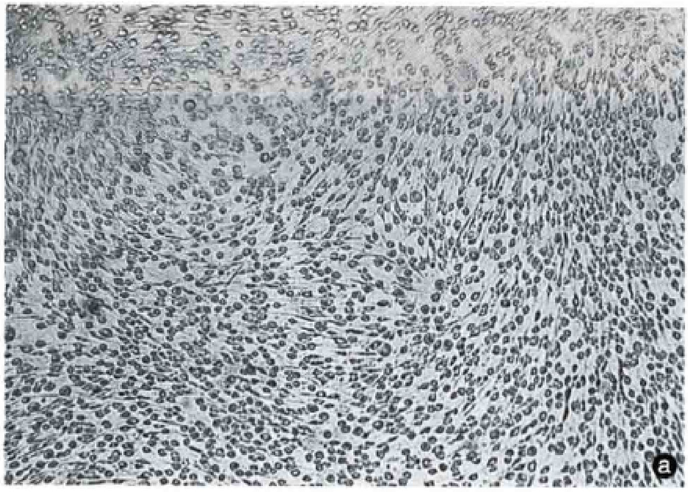


图 100-1 a. 正常人二倍体成纤维细胞，放大倍数，×400 倍；b. HSV-1 在人二倍体成纤维细胞中的 CPE，放大倍数，×400 倍；c. 正常貂肺细胞，放大倍数，×100 倍；d. HSV-2 在貂肺细胞中的 CPE，放大倍数，×100 倍；e. 正常 Hep-2 细胞，放大倍数，×400 倍；f. HSV-2 在 Hep-2 细胞的 CPE，放大倍数，×400 倍，见彩插



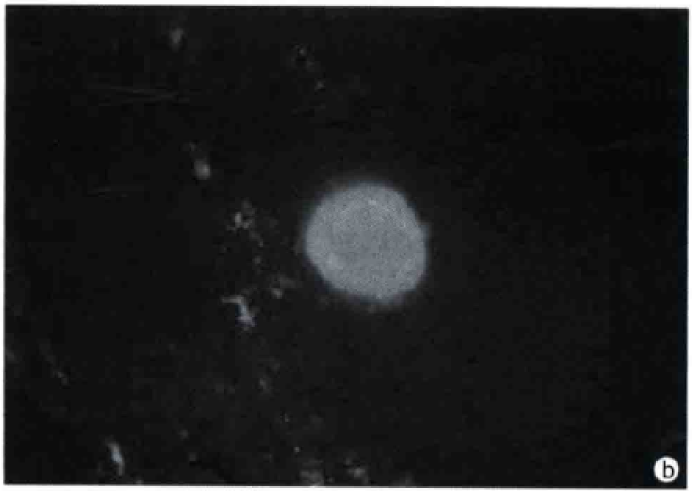


图 100-2 a. HSV 对人二倍体成纤维细胞的毒性反应；放大倍数，×100 倍；b. HSV-2 直接荧光抗体确证试验，见彩插

表 100-3 HSV-1 和 HSV-2 免疫荧光法检测、确证和分型的单克隆抗体

试剂	来源	预期的用途	注释和说明
Light Diagnostics SimulFluor HSV1/2	Millipore, Billerica, MA	细胞培养中确定 CPE 对细胞离心涂片制备的临床样本进行直接检测	HSV-1：全细胞染色（苹果绿） HSV-2：胞浆或胞膜染色（黄色） 同时检测 HSV-1 和 HSV-2
Light Diagnostics SimulFluor HSV/VZV	Millipore, Billerica, MA	细胞培养中确定 CPE 对细胞离心涂片制备的临床样本进行直接检测	同时检测 HSV-1、HSV-2 和 VZV
Light Diagnostics HSV1 和 HSV2 DFA 分型试剂盒	Millipore, Billerica, MA	直接标本和细胞培养中区别 HSV-1 和 HSV-2	检测 HSV-1 和 HSV-2 需要独立斑点
D3 DFA 鉴别和分型试剂盒	Diagnostic Hybrids, Athens, OH	细胞培养中确定 CPE 和分型	HSV-1：强的胞核内局部染色 HSV-2：强的胞核和核周染色
MicroTrak HSV1&2 培养鉴定/分型试验	Trinity Biotech, Jamestown, NY	细胞培养中确定 CPE 和分型 套片小管培养出现 CPE 之前进行抗原检测	HSV-1：胞核染色 HSV-2：强的胞核染色，伴胞浆内的斑点状染色

十、血清学试验

因为几乎所有 HSV 病毒结构蛋白具有广泛的抗原交叉反应性，所以只有基于型特异性 HSV gG 的 IgG 试验能够准确区分 HSV-1 和 HSV-2 抗体[21,132-133]。基于未经纯化的抗原混合物的检测仍有市售，但其具有不能接受的低敏感性和低特异性，特别对于检测那些已有 HSV-1 感染的新发 HSV-2 感染[21,132,134-135]。FDA 批准的 IgM 试验减少新发感染患者的检测血清学阳转的时间，但不能准确地区分新发感染和既往感染[136]。基于 IgM 的试验也容易获得假阳性结果[137-138]，因此应该用其他方法来确证。大多数情况下，HSV-2 抗体亲和力试验能准确区分首次发作（低亲和力）和复发（高亲和力）[139]。然而，这些试验还未商品化。

(一)蛋白印迹试验

华盛顿大学实验室所用 HSV 蛋白印迹试验采用人二倍体成纤维细胞感染细胞蛋白制备的硝酸纤维素膜斑点。蛋白印迹试验检测多种病毒蛋白的抗体，包括型特异性的糖蛋白 gG-1 和 gG-2[140]。约 20% 的血清需要预先吸附在包被有 HSV-1 和 HSV-2 蛋白的交联琼脂糖珠上，再次测定给出确定结果。这种联合试验可非常准确地测定 HSV-1 和 HSV-2 抗体的状态[140]，并且被认为是与其他血清学试验比较的“金标准”。

(二)商品化基于型特异性 gG 检测

现在许多制造商提供 FDA 批准的用 gG 作为靶抗原的检测。如上所述，基于 gG 的检测比基于未经纯化的抗原混合物的检测更受欢迎，因为它们能够区分 HSV-1 和 HSV-2 抗体。微孔板式酶免疫分析法(EIAs)包括 Focus Diagnostics(Cypress，CA)的 HerpeSelect ELISA(酶联免疫吸附试验)、Captia HSV1 和 HSV2 IgG 型特异性 ELISA 试剂盒(Trinity Biotech，Bray，Ireland)、Euroimmun(Lubeck，Germany)的抗 HSV-1 和抗 HSV-2 ELISA IgG 试剂盒、Gold Standard Diagnostics (Davis，CA)的 HSV-1 IgG ELISA 试验、SeraQuest HSV-1 和 HSV-2 特异性 IgG 检测(Miami，FL)，以及 Zeus ELISA HSV-1 和 2 试验系统(Raritan，NJ)。Roche Elecsys HSV-1 IgG 和 HSV-2 IgG 检测是经 FDA 批准用于几种自动化免疫分析仪器。一些较新的试验利用基于微粒的检测技术，这为多重检测提供可能，并且具有高通量和重复性好的潜在优势。Plexus HerpeSelect 1 和 2 IgG 试剂盒(Focus，Cypress，CA)、BioPlex 2200 HSV 1 和 2 试剂盒(Bio-Rad)，以及 AtheNA Multi-lyte HSV-1&2 (Zeus Scientific，Raritan，NJ)利用 Luminex 检测技术(Luminex，Austin，TX)。Liaison HSV-1 和 HSV-2 型特异性 IgG 试验是基于微球的化学发光免疫分析，需要使用 Liaison 分析仪(Diasorin，Saluggia，Italy)。最后，还有为床旁检测设计的简单的基于 gG 的侧流试验。这些包括能区分 HSV-1 和 HSV-2 抗体的 HerpeSelect Express IgG(Focus Diagnostics)，以及 Biokit HSV-2 快速试验(Biokit，Barcelona，Spain)。

在北美洲，商品化基于 gG 的检测在临床应用中表现良好。与华盛顿大学蛋白印迹试验相比，HerpeSelect ELISA 对 HSV-1 的敏感性和特异性为 91%～96%和 92%～95%，对 HSV-2 的敏感性和特异性为 96%～100%和 96%～97%。HerpeSelect Immunoblo 对 HSV-1 敏感性和特异性为 99%～100%和 93%～96%，对 HSV-2 的敏感性和特异性分别为 97%～100%和 94%～98%[133]。与免疫印迹法相比，BioPlex 检测对 HSV-1 的敏感性和特异性分别为 85%和 98%，对 HSV-2 的敏感性和特异性分别为 100%和 95%[136]。基于 Luminex 分析展示出与 Focus HerpeSelect EIA 的良好一致性：AtheNA Multi-lyte HSV-1&2 为 94.9%，BioPlex 2200 HSV-1 和 2 试剂盒为 97.8%和 Plexus HerpeSelect 1 和 2 IgG 试剂盒为 97.4%[141]。对于床旁检测，比对实验显示 POCkit-HSV-2 试验(现在称 Biokit HSV-2 快速试验)的敏感性为 93%～96%、特异性为 95%～98%[133]。虽然并不清楚与免疫印迹法性能特点的差异，当与 HerpeSelect ELISA 相比时，HerpeSelect Express IgG 检测的敏感性为 100%，特异性为 97.3%[142]。对 HerpeSelect HSV ELISA 和 Biokit HSV-2 快速试验的血清学阳转中位时间为 2～3 周[143-144]。

十一、抗病毒药物敏感性

HSV 的阿昔洛韦耐药株通常是由编码病毒胸苷激酶的基因突变所致，更少见的是由 HSV 聚合酶的基因突变所致，而膦甲酸耐药仅由 HSV 聚合酶突变所致。对新型 HSV 抗病毒药物普利特韦的耐药与 HSV 解螺旋酶和引物酶基因的突变有关，但在体内尚未见此现象[145]。长期使用抗病毒药物可导致选择出耐药毒株，特别是在免疫功能低下的个体和新生儿[146]。从未接受过阿昔洛韦治疗的患者中也能分离到体外耐药性的毒株[147]。这些分离株对免疫功能正常个体很少有临床意义，这些人通常对阿昔洛韦治疗反应良好[148]。然而，可以偶尔在免疫豁免部位甚至免疫健全个体中观察到耐药[149]。耐阿昔洛韦的 HSV 能导致治疗失败[148]，因此，耐药性的实验室确认能够预示患者治疗管理决策。一些疑似对阿昔洛韦耐药的患者增加用药剂量后治疗效果好。对大多数患者来说，二线治疗需要使用不太理想的药物如膦甲酸或西多福韦。由于一些 HSV 聚合酶突变引起阿昔洛韦的耐药，但并不影响喷昔洛韦的敏感性。在某些情况下可能需要保证对个别抗病毒药物进行敏感性试验[146]，因为这样可以允许使用一些毒性较小的药物。

敏感性试验可通过表型检测确定，因为基因型检测目前只用于研究。在表型检测中，空斑减少试验被认为是金标准[146,148]。其他的表型检测方法包括用 EIA 检测抗原减少和 DNA 杂交检测基因组减少[146]。一般来说，半数(50%)抑制浓度<2 μg/ml 作为敏感性的阈值，并且与临床反应

相关性相对较好[150]。然而，在不同的表型检测中常常对耐药性判断错误，各实验室之间的差异也非常显著[146]。因此，检测结果的临床相关性是至关重要的。考虑到抗病毒药物耐药表型检测的周转时间长和测序的改进，基因型抗病毒药物敏感性检测很可能在未来发挥作用。目前，基因型检测的一个主要缺点是移码或无义突变可能遍及整个相关基因，需要对基因进行完整测序才能确定结果[146]。需要更完整的与抗病毒药物耐药相关的突变数据库来明确基因型与耐药的关系。

十二、结果的评价、解释和报告

最好结合患者的临床表现、病史及 HSV 感染的自然史知识等背景来解释实验室结果。

(一)病毒检测试验的解释

阳性试验结果的解读取决于试验的特异性。如果进行确证试验，培养方法的特异性是极高的。鉴于其极佳的敏感性和特异性，PCR 在许多情况下成为首选方法。当使用封闭系统方法及严格执行的实验室操作以避免外源性 HSV DNA 对标本的污染时，PCR 是最可靠的。即使在使用封闭系统时，HSV PCR 检测的分析前污染也可能发生在医嘱申请处或实验室中。在实际中，尽管有这些警告，阳性培养或 PCR 结果在有龈口炎、生殖器疱疹或眼部感染病损的患者中有很高的诊断价值。病损处或眼部拭子的阳性荧光抗体试验被认为是可靠的。在中枢神经系统、组织、血液或眼部通过培养或 PCR 方法检出的 HSV 有诊断意义。在有症状的 1～3 周龄婴儿中出现阳性的培养或 PCR 试验结果则具有很高的诊断价值[151]。

对于其他患者，需要谨慎解释阳性病毒检测结果。一个潜在使人困惑的问题在于多种潜在病原体的同时共存。例如，免疫低下患者的呼吸道分泌物除了可能含有 HSV，另外包括可能的病原体如呼吸道合胞病毒、流感病毒、副流感病毒或腺病毒[152-153]。HSV 也可能同时与其他病原体从口腔或肛门生殖部位一并排毒，或者未必是造成驱使患者进行检测的偶然发生病症的原因。在美国梅毒和软下疳是最可能导致生殖器溃疡的另外原因。在一系列非典型疱疹(水疱-脓疱性病变)生殖器溃疡的患者中，65%仅检测到疱疹病毒，而20%同时检测出梅毒和疱疹病毒[154]。这些患者的 HSV 结果在鉴别诊断时需要结合其他病原体实验室检测进行解释。HSV 龈口炎或生殖器感染的症状可能与非感染性原因(如 Stevens-Johnson 综合征)，或其他感染性病原体引起的症状相似。由于无症状性 HSV 排毒的散发特性[155]，当疾病的根本原因不是疱疹病毒的状况下，口腔或肛门生殖道拭子也可能产生 HSV 分离培养、PCR 和抗原检测的阳性结果。即使在脑膜炎中，HSV 阳性结果也不意味着临床医生不需考虑其他原因，临床相关性总是需要考虑的[120]。越来越多症候群多重检测的问世，可能有助于更好地理解多种病原体在感染中发挥的作用。

从小于 24 h 龄新生儿的皮肤、结膜、口腔或鼻拭子获得阳性病毒分离培养或 PCR 结果可能反映母亲的病毒感染而不是新生儿的感染。分娩时从生殖道排出 HSV 的母亲所产出的新生儿可在出生后 24～72 h 进行检测，这个时间段获得的可能是母亲的病毒培养或 PCR 结果。大多数婴儿在出生后 9～14 天[156]出现新生儿疱疹的临床表现，远超出了母亲病毒污染的时间段，这可能带来难题。然而，早期启动治疗与好的预后密切相关[157]，因此，目前的观点支持积极的监测和治疗[61]。

PCR 具有足够的敏感性，能够在无症状感染或者阴性培养结果个体中检测 HSV 排毒[158-160]，也能在 HSV 分离培养的阳性检出率低的 CSF 中检测 HSV。有报道 HSV PCR 对 HSV 脑炎的敏感性约为 96%，特异性约为 99%[105,117,161]。由于在 HSV 脑炎 CSF 中的病毒载量相当低，把 PCR 检测最优化以提供最佳的可能检测限是至关重要的。对于检测生殖道的 HSV-2，无论是有病损还是亚临床排毒，PCR 都远比分离培养的敏感性高[52]。PCR 能够在早期病变进展过程中检测出病毒，早于分离培养报告阳性结果，并且在 HSV 病损处分离培养阴性后数天 PCR 还能持续阳性[158,162]。这些情况下 PCR 阳性可能代表感染病毒含量低于分离培养的检测限，在没有活动性排毒时，PCR 阳性快速消失[159]。由于反应失败或者临床样本中抑制剂的存在，在 PCR 中也可能出现假阴性。因此，非常关键的是只有阴性反应伴随着阳性内部质控才能被认为是真阴性[163]。此外，由于引物或探针结合区域的序列变异也可能发生 PCR 假阴性[127]。重要的是，HSV 阴性的 PCR

结果不能排除HSV疾病，因为在疾病过程的极早期或极晚期采集的样本可能不含有病毒DNA[164]，特别是在儿童群体中。在一项研究中，接近25%的中枢神经系统HSV感染的婴儿CSF PCR结果是阴性的[151]。据报道，检测HSV脑炎的PCR的特异性>98%[165]，因此，所有HSV阳性PCR结果需要即刻关注。中枢神经系统HSV感染的患者，在抗病毒治疗大约7天后HSV PCR可能转阴[161]。抗病毒治疗后病毒的持续存在或再次出现，与临床预后差有关[166]。

定量PCR有助于监测抗病毒治疗的反应。成功的治疗与CSF中病毒载量下降相关[109,167-169]，长期检测出病毒与预后差相关[170]。HSV定量也可能具有评估预后的价值。据报道，病毒载量越高的患者可能临床预后越差[175]。在一项研究中，那些CSF中>100拷贝/μl(100 000拷贝/ml)的患者比低于该水平的患者临床预后更差[169]。然而，其他研究表明CSF病毒载量和临床预后之间没有关联[167-168,170,172]。

(二)型特异性血清学试验的解释

当病毒分离培养或其他病毒检测方法不可用、样本采集或运输不当或没有临床疾病而需要评估血清学状态时，型特异性血清学试验很有用。基于gG-1和gG-2的血清学试验对诊断亚临床或未确认的HSV感染是十分重要的。很多专家相信，通过使用准确的基于gG血清学试验能更好地识别生殖道HSV-2感染，可帮助减缓生殖道疱疹的传播[173-175]。然而，美国预防服务工作组在回顾分析了潜在的益处和危害之后，最近建议在无症状人群中对生殖器HSV感染进行血清学筛查[176]。

和其他疱疹实验室检测项目一样，基于gG的血清学试验需要谨慎的选择和解释。首先，由于非基于gG商品化检测的特异性低，确保使用基于gG的检测非常重要。如果使用了基于gG的检测试剂，一个有生殖道病损的患者HSV-2抗体试验阳性很可能是真阳性。在没有相应的生殖道疱疹病史的患者中出现阳性HSV-2抗体检测的结果，可能是假阳性，应该用不同的型特异性试验确认[177]。有症状的生殖道感染的患者HSV-2检测结果为阴性时，可能表明为生殖道HSV-1；没有检测能够区分口腔和生殖道HSV-1感染产生的抗体，对这些患者的明确诊断需要依靠对病毒的直接检测。在血清抗体阳转期也可发生假阴性试验结果，4～6周后应采集血清再进行检测。虽然在血清学转变期HSV-2 EIAs中的“指数值”有所升高，但单独的指数值不是病毒感染早期与已有感染相比的可靠指标[178]。基于gG-1和gG-2的IgM检测还没有商品化。可用的IgM检测不能足够准确鉴别新发的还是已有的有症状感染，因此不推荐使用[136]。

综上所述，型特异性血清学试验对于识别有新发HSV感染的孕妇是重要的，因为这些孕妇具有向她们的新生儿传播病毒的高风险[61,175]。推荐在妊娠早期确定HSV-2血清学状态，以供选择治疗方案[175]。如果在分娩时来自生殖道肛门区域的疱疹培养为阳性，而产妇的型特异性血清学阴性，表明新生儿疱疹风险高(30%～50%)。通过蛋白印迹法或其他等效方法检测母亲血清学阳性，表明传播的风险较低(1%～3%)。

十三、乙型疱疹病毒

(一)病原体描述

乙型疱疹病毒，也被称作恒河猴疱疹病毒1型(以前称为猕猴疱疹病毒)或猴B病毒，在基因组大小和结构方面及病毒体形态方面与HSV相似。乙型疱疹病毒DNA长度为(161±12)kbp[179]，富含G+C区域(约为75%)。

乙型疱疹病毒的复制周期和HSV非常相似。乙型疱疹病毒在感染后6 h就能检测到，病毒的滴度能稳定24～36 h[180]。已经确定的乙型疱疹病毒糖蛋白至少有9种，这其中至少2种与HSV糖蛋白B和D有共同的抗原决定簇[181]。作为一个有包膜的病毒，乙型疱疹病毒能够被脂质溶剂、紫外线或加热灭活，因此，游离于细胞的病毒在环境中很快地被灭活。

(二)临床意义

乙型疱疹病毒相当于猴的HSV，存在于猕猴属的旧世界猴中，包括恒河猴、食蟹猴、日本猕猴、台湾猕猴和短尾猕猴。乙型疱疹病毒能够侵犯口咽部或生殖道部位，通过撕咬、性活动或其他密切接触在动物之间传播[182-183]。乙型疱疹病毒在野生成年猕猴中的血清学阳性率接近75%[184]。在户外围栏中饲养的猕猴，2.5岁以内者血清学阳性

率约为 22%，2.5 岁及以上者升高到 97%以上[185]。猕猴中原发感染常常是无症状的，但病毒能够潜伏和再激活。应激可触发病毒再激活，例如，从自由状态转变到圈养或者拥挤的环境。猕猴中复发性疾病的典型特征是舌头及颊黏膜的水疱样病变，进展为溃疡。脑炎很少见但可以发生，也能发生无症状排毒。

1932 年，一个研究者被猕猴咬伤且发展为上行性脊髓炎和脑炎，最终导致死亡，随后乙型疱疹病毒被描述[186]。后来有文献报道人类感染乙型疱疹病毒的散发病例。人类能够通过动物咬伤、黏膜或眼部的暴露[187]、破损皮肤的接触、针刺伤，或可能通过气溶胶发生感染。乙型疱疹病毒传播的可能性使得猕猴不适合作为宠物[188]。目前已出版了与猕猴密切接触的工作人员的安全预防措施和暴露后处理的建议[189]。猕猴的原代细胞培养也是病毒的潜在来源[189]。

人类的乙型疱疹病毒疾病十分严重，未经治疗的死亡率为 70%或者更高。首发症状通常出现在暴露后 3～5 天(虽然也能久至数周后出现)，接触部位会有一个局部的血管病变、红斑和水肿。随后会有淋巴管炎和淋巴结病，伴有发热、肌痛、呕吐和痉挛。神经系统的体征会很快出现，开始为脑膜刺激症、复视和感觉改变，进一步进展为瘫痪、精神异常、呼吸抑制、癫痫，进而在 10 天至 6 周内死亡。人际传播似乎极其罕见[190]。人类中无症状感染也似乎少见。在一项超过 300 名灵长类动物驯化者(其中超过 150 人有暴露史)的研究中，没有一个有乙型疱疹病毒抗体[191]。

阿昔洛韦对乙型疱疹病毒有效，尽管其半数(50%)有效剂量高于 HSV 的 10 倍。虽然更昔洛韦的临床经验有限，但其似乎比阿昔洛韦更有效[192]。膦甲酸在某些情况下也可使用[187]。暴露后治疗常能阻止急性发病[193]。暴露后预防首选药物是口服生物利用度更高的伐昔洛韦[189]。临床疾病必须静脉抗病毒治疗。静脉用药应该持续到症状消失，并保持无症状 10～14 天后 2 次或以上的病毒培养结果为阴性，这时才可以更换为口服的抗病毒药物[189]。一些患者在停止抗病毒治疗后会发生病毒再激活和复发。因此，许多临床医生建议无限期继续口服抗病毒治疗。

(三)样本的采集、运输和储存

因为乙型疱疹病毒只能在 4 级生物安全水平的条件下进行增殖，诊断用样本最好由专门的参考实验室处置(见下文)。其他实验室应该采取预防措施以确保乙型疱疹病毒样本不会和 HSV 样本混淆，以及不会在较低生物安全的条件下进行培养，因为经培养扩增病毒会增加实验室人员的风险。从每一个采集部位采集的病变拭子应使用独立、无菌、带有木质或塑料柄的 Dacron 拭子或者棉拭子。拭子或活检组织应该放进含有 1～2 ml VTM 的独立管子中。样本能够在 4℃冰箱中储存长达 1 周或在低于－60℃条件下长期储存。

(四)乙型疱疹病毒参考实验室

对乙型疱疹病毒进行诊断，正确采集样本及运输样本的建议可以从 CDC 网站(http://www.cdc.gov/herpesbvirus/index.html)或者从亚特兰大佐治亚州的国家 B 病毒资源实验室(电话 404-413-6550；http://www.gsu.edu/bvirus)获得。

(五)病毒鉴定和血清学诊断

乙型疱疹病毒可以用猴肾细胞及鸡胚细胞培养。可观察到和 HSV 相似的典型细胞病变效应，具有多核体形成及核内 Cowdry A 型包涵体。培养中乙型疱疹病毒的确证可以用单克隆抗体或分子技术完成。用于诊断目的时，通常首选乙型疱疹病毒的 PCR[194-196]而非培养，因为它相对快速并且具有高的敏感性和特异性，以及避免了感染性病毒的高滴度增殖。

由于与 HSV-1 和 HSV-2 之间存在广泛的交叉反应，乙型疱疹病毒感染的血清学诊断很复杂。然而，已经研发出来精细的 ELISA 和免疫印迹法，能够区分乙型疱疹病毒、HSV-1 和 HSV-2 的抗体[197-199]。血清学试验可用于评估涉及人暴露的潜在感染动物及筛查研究用动物。血清学状态的连续检测也可用于潜在暴露个体的辅助诊断[187,189]。

参考文献请扫二维码查阅

第101章 水痘-带状疱疹病毒

ELISABETH PUCHHAMMER-STÖCKL，STEPHAN W. ABERLE

（陶传敏 译；徐修礼、王辉 审校）

一、分类学

水痘-带状疱疹病毒（varicella-zoster virus，VZV）根据形态学标准属于疱疹病毒科，是至今发现的8种人类致病疱疹病毒之一。根据其生物学特性，它与单纯疱疹病毒（HSV）一起归入α疱疹病毒亚科（*Alphaherpesvirinae*）[水痘病毒属（genus *Varicellovirus*）、人疱疹病毒3型（*Human Herpesvirus* 3，HHV-3）]。

二、病原体描述

VZV是一种直径180～200 nm有包膜的病毒，见图101-1*。它包含一个由被膜结构包绕的20面体核衣壳、一层脂质包膜（使得病毒可被脂溶剂降解）和一条线形双链*DNA*基因组[1]。该病毒基因组长度约为125 000 bp，携带着至少70个病毒基因[2]。*VZV*基因组由一个独特的长区域（UL）、一个独特的短区域（US）、位于侧面内部及末端的重复区域组成，它可以4种异构形式存在（图101-2）。

VZV可通过细胞表面融合或细胞内吞作用感染易感细胞。病毒复制发生在感染细胞的细胞核中，与其他疱疹病毒的复制部位相似，病毒基因表达的进程是高度受调控的。目前并非所有VZV基因的功能都已知晓。特别熟知的一些特征性基因包括一些转录调节蛋白（IE61～IE63）、病毒酶类如胸苷激酶[TK，由可读框（ORF）36编码]、

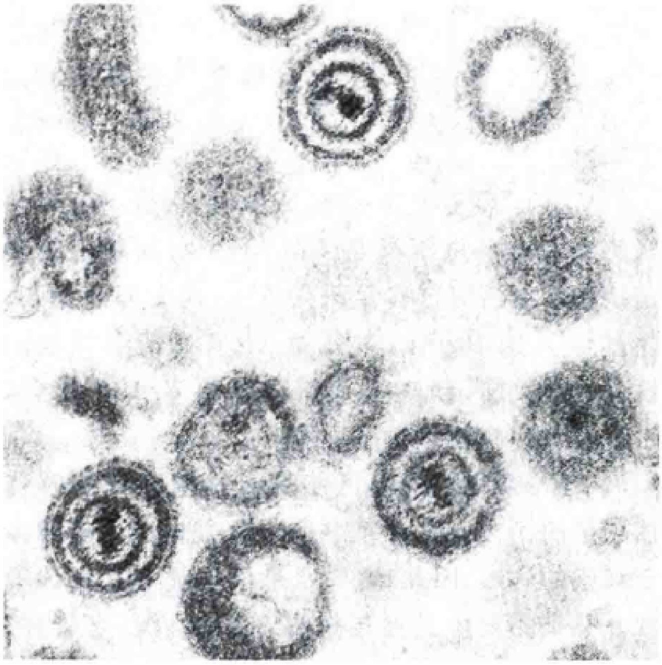


图101-1 Electron micrograph of VZV in skin vesicle fluid from a patient with varicella. Magnification，×100 000. (Reprinted from reference 125.)

DNA聚合酶（ORF 28）及多种VZV糖蛋白的基因如*gB*（*ORF31*）、*gE*（*ORF 68*）和*gH*（*ORF 37*），这些糖蛋白在病毒黏附和引起宿主免疫应答方面是必需的。

与其他疱疹病毒相比，VZV分离株基因组的多样性较低[3]。通过全基因组测序，已经建立了5个主要VZV进化支（clades）和2个临时基因型[4-5]。无证据表明自然流行的VZV毒株的毒力有显著不同。

---

*译者注：原著引用其他著作图，未经原作者授权翻译，故此保留原图

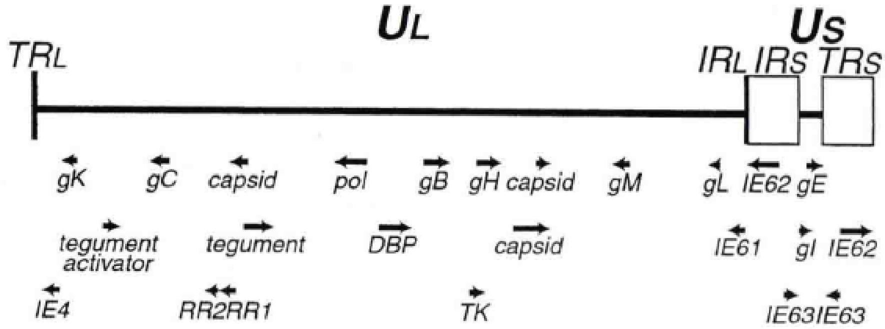


图 101-2 VZV 线性双链 DNA 基因组示意图

注：UL. 独特长片段(100 kbp)；US. 独特短片段(5.4 kbp)；TRS 和 TRL. 终端重复区域；IRS 和 IRL. 内部重复区域。箭头所指为病毒基因转录的方向。RR. 核糖核苷酸还原酶；DBP. DNA 结合蛋白(转载自参考文献[126])

三、流行病学和传播

VZV 广泛存在和很高传染性，因此，VZV 原发感染多出现童年早期。在 11 个欧洲国家的疫苗接种前血清流行病学研究显示，在大部分地区，超过 90%的 10～15 岁儿童 VZV 血清学试验阳性[6]。在美国，自 1995 年普遍接种 VZV 疫苗后，水痘的发病率已经明显下降[7]。

VZV 原发感染最可能是通过病毒气溶胶传播获得的。在皮肤水疱中也会产生高水平的游离于细胞的病毒，因此，这些水疱液也具有高度传染性。感染的发生是通过病毒在呼吸道黏膜接种，在扁桃体淋巴组织内复制，随后病毒经淋巴组织最可能是通过 T 细胞而播散[1]，潜伏期为 10～21 天。在潜伏期内，病毒通过病毒血症播散，也可以在网状内皮组织器官中复制，最终感染皮肤上皮细胞，后者是病毒复制最主要的场所[1]。最终，受到感染的宿主通过呼吸道开始排毒。皮疹出现后含有感染性疱液的新囊疱持续数天出现。一旦最后一批水疱干燥和结痂，个体不再具有传染性。

在原发 VZV 感染后，病毒在神经节潜伏。再次激活时，可能会发生带状疱疹。带状疱疹的疹疱充满了含有病毒的液体，也可能是 VZV 血清学阴性易感人群的原发感染来源。病毒也能在妊娠期间由母亲传播给胎儿[8]。

四、临床意义

水痘(varicella，又叫 chickenpox)是 VZV 原发感染的表现。水痘的临床表现常以全身性水疱性皮疹为主。有时，发热、全身不适或腹痛等作为前驱症状出现在皮疹发作前 24～48 h 或在皮疹发作期间的头几天。新的水疱出现在水痘最初 3～6 天。由于其特征性的临床表现，水痘的诊断通常依据临床，不需要实验室确证。VZV 的临床再感染在免疫功能正常或免疫功能抑制的个体中已经有报道[9-10]。水痘可以发生相关并发症[11]，并且高龄、免疫抑制和妊娠通常被认为与较高的并发症发生率有关。

水痘最常见的并发症是皮肤损伤处的继发细菌感染，它可导致脓肿、淋巴结炎，极少数也可导致菌血症及脓毒症。特别是在健康成年人中，水痘可以并发 VZV 肺炎，其发生率是儿童的 25 倍，据报道其在孕妇中也特别严重[12]。成人水痘的住院率约每 1000 个报告病例中有 32 例，是儿童的 6 倍以上[13]。

水痘期间可以发生 VZV 脑炎，这是由于原发感染或感染后进程，通常表现为急性小脑共济失调症状[14]。其他并发症包括肝炎、肾炎或急性血小板减少症。在免疫抑制患者中，可以发生广泛性全身播散，如果不及早治疗，可导致多器官感染甚至死亡。

在妊娠的最开始的 21 周期间发生 VZV 原发感染可能导致胎儿先天性水痘综合征，表现为皮肤瘢痕、四肢萎缩，在少数病例中表现为癫痫、小头畸形和其他后遗症。该临床综合征与 VZV 的关系已通过 PCR 在胎儿组织中检出病毒 DNA 所证实[15]。其发病率低，在妊娠前 6 个月内发病率<1%[16]。在出生后 4 日龄内或母亲水痘疹出现后 2 天内出生的婴儿中，新生儿水痘可能导致

严重的播散性感染。

原发感染后，VZV 以潜伏状态持续存在于宿主的感觉三叉神经和背根神经节。VZV 最可能自皮肤损害处经轴突逆向运输，最终可通过血液播散到达感觉神经节[1]。在潜伏感染宿主中检测到的病毒数量不同，在每 100 000 个神经节细胞中包含 500～55 000 个病毒基因组拷贝[17]。在 VZV 潜伏期间，可以观察到不同基因的转录与翻译[18]。病毒保持在受控制状态，主要是通过宿主的 VZV 特异性 T 细胞免疫。当免疫受抑制或高龄导致免疫力降低时，可能发生病毒再激活。

VZV 再激活可能引起限制性的亚临床局部感染，或病毒可以通过神经元扩散到皮肤，导致带状疱疹（herpes zoster）临床综合征。带状疱疹主要特征是水疱性皮疹，典型地局限在免疫功能正常宿主由单个感觉神经支配的皮节（dermatome）[1]。由于感觉神经元受累，疱疹的出现通常先于或伴随着强烈的神经性疼痛。眼也可能受到影响，导致眼部带状疱疹。VZV 特异性 T 细胞应答的增加限制了病毒的扩散。带状疱疹最常见并发症是带状疱疹后遗神经痛，它表现为严重的疼痛，可以在带状疱疹后持续数月。

在免疫功能正常宿主中，带状疱疹最严重并发症与中枢神经系统（central nervous system，CNS）VZV 感染相关。可观察到病毒性脑膜炎、脊髓炎或脑炎，其中脑炎发生可能是由于神经元传播引起。也可以见到面部麻痹综合征的病例。在大多数情况下，带状疱疹是基于其特征性的表现和水疱的分布来进行临床诊断。然而在某些情况下，病毒再激活也可能会导致无疹型带状疱疹（zoster sine herpete），它是一种不明确的局部疼痛综合征，有时也与无水疱性皮疹的中枢神经系统感染相关。无疹型带状疱疹只有经过病毒学检测才能做出诊断，它可能比以往所认为的更常见。约 25％伴有中枢神经系统并发症的无疹型带状疱疹病例是由病毒学确证的 VZV 再激活所引起[19]。此外，VZV 再激化可引起颅内和颅外血管病变。短暂性脑缺血发作、中风或巨细胞动脉炎患者，特别是在发生带状疱疹或水痘之后，应考虑动脉 VZV 感染[20-21]。

在免疫受抑制宿主，原发感染和再激活可以导致严重的甚至可危及生命的全身性感染。在没有疫苗的年代，伴有高死亡率的严重播散性原发感染是免疫抑制儿童最令人担心的事。这在疫苗接种率低的群体中仍然是一个重要问题。在骨髓或实体器官移植后，患者经常出现 VZV 再激活发作，有时进展为严重播散性感染和内脏带状疱疹，临床特征为严重腹痛，与肝、结肠或肺等内脏器官受累相关[22-26]。在实体器官移植受者中，肺移植患者尤其具有 VZV 并发症的高风险[27]，但 VZV 也可能导致血液恶性肿瘤患者或造血干细胞移植患者的很多问题[28]。HIV 感染个体也可能会发生严重的 VZV 再激活的发作和感染扩散，特别是在 AIDS 期，他们可出现不同寻常的临床表现[29-31]。VZV 在免疫重建炎症综合征的发展中也起作用，在开始高效抗逆转录病毒治疗（highly active antiretroviral therapy，HAART）后 4 周内患者可能出现皮肤黏膜的带状疱疹[32]。

VZV 导致的疾病可以通过接种疫苗预防。20 世纪 70 年代早期应用日本 Oka 株研发出减毒活疫苗，1995 年，该疫苗由美国批准用于水痘易感人群，现在已被多个欧洲国家推荐使用[33]。美国儿童期疫苗接种政策使得水痘发生率[34]、疾病严重程度、相关并发症均显著减少[35]。一种从 Oka 株衍生的非活性重组疫苗也已经研发出来，可以用于增强老年患者对 VZV 的免疫力，从而防止带状疱疹再激活[36-37]。

水痘-带状疱疹免疫球蛋白可能预防严重的水痘，因此，被用于高风险患者人群以避免疾病的发生。为了避免胎儿发生先天性水痘综合征，妊娠开始的 21 周内血清学阴性的孕妇在暴露 VZV 后 72 h 内可给予商品化 VZV 免疫球蛋白[8]。在免疫功能受抑制的 VZV 血清学阴性患者中，例如，造血细胞移植患者，推荐在 VZV 暴露后 96 h 内应用 VZV 免疫球蛋白以避免发生严重的全身性感染[38]。

VZV 感染的早期快速诊断非常重要。不同检测方法已可供使用，见表 101-1。由于敏感性高，PCR 已大大地取代病毒培养，并成为多数情况下首选的方法。抗原检测仍是有用的，因为它可以快速完成并可随时进行。血清学方法在确定免疫力方面最有用。

对 VZV 感染和再激活的特异性抗病毒治疗是可能的。如果治疗是必要的，通常使用核苷类似物，如阿昔洛韦或喷昔洛韦，或有更好的口服生物可利用的前体药物——伐昔洛韦和泛昔洛韦。

表 101-1 VZV所致疾病的诊断试验

方法	检测目标	适用的标本(疾病)	注释和说明
PCR	ORF 17,29,31,62和69	体液、细胞、或病变损伤处痂皮(水痘,带状疱疹) 血液(播散性感染,无疹型带状疱疹) 脑脊液(脑炎、脑膜炎、脊髓炎、面瘫、无疹型带状疱疹) 组织(活检)	最敏感的方法,与病毒培养相比更快得到结果,可定量
直接荧光抗体试验(DFA)	gE	病变损伤处细胞(水痘、带状疱疹) 组织(活检)	较病毒分离培养敏感。用时少(<2h);随到随做
分离培养	感染性病毒	病变损伤处液体或细胞(水痘、带状疱疹) 血液(播散性感染、无疹型带状疱疹) 组织(活检)	疾病早期阳性(水痘疹出现后<2天)。因为病毒非常不稳定,分离可能困难。传统诊断标准由于缺乏敏感性且用时长(7~10天出现细胞病变效应),目前已大部被PCR取代
血清学试验	抗VZV IgM,IgG	血清(主要用于评估免疫力)	不推荐用于疾病诊断;可出现假阳性及假阴性IgM结果。检测IgG水平需要急性期和恢复期(间隔7~10天)的样本

溴夫定是另一种被证实对VZV有效的核苷类似物[39]。当临床并发症出现时,抗VZV治疗应用于免疫低下宿主或免疫正常的患者。此外,带状疱疹再激活也需要治疗以限制带状疱疹后遗神经痛及预防累及眼部。

五、样本的采集、运输和储存

依据临床表现和检测方法,多种样本可用于诊断,见表101-1。水疱液中含有游离于细胞外的病毒,常是高浓度的。因为几乎所有水痘患者和许多带状疱疹患者都表现为水疱性皮疹,并且因为水疱液的采集非常方便,来自水疱液的实验室诊断是检测或确证VZV感染或再激活的主要诊断工具。水疱液可以用毛细吸管或注射器采集。对于PCR分析,水疱液也可用拭子采集并置于生理盐水或病毒运送培养基运输至实验室。如果有进一步做病毒分离培养的计划,要记住用拭子采集的病毒稳定性差,并且也会在培养基中进一步稀释,这可能降低病毒培养的效率。

通过PCR技术可在血浆、血清、全血和外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cells,PBMCs)中检测VZV DNA。血浆或血清因容易采集而常规使用。如果进行PCR检测,全血样本应该置于除肝素以外的其他抗凝剂中运送,因为肝素可以抑制Taq聚合酶。病毒可以在疾病早期从PBMCs中复苏获得,然而,这种方法主要用于研究。脑脊液(cerebrospinal fluid,CSF)应该置于一个无菌容器中运送。通常,未经离心的CSF用于检测VZV DNA,但病毒也可在细胞层或上清液中检测到。

组织检测主要在活检时进行。在播散性疾病中,由于试验敏感性和样本容易获得,组织检查现已在很大程度上被血液样本PCR取替。来源于组织的细胞可用免疫荧光染色。细胞压片的制备可将组织(通常为10~15 mm)按压载玻片的清洁面数次获得,长度超过30~40 mm。玻片在空气中自然干燥,用冷丙醇固定,再用检测抗原的试剂染色(见下文)。组织匀浆准备如第81章描述,可用于病毒培养或PCR检测。

一般来说,最终用PCR方法扩增VZV DNA在采集、运输和储存期间是相当稳定的。然而,VZV完整病毒颗粒相当不稳定,因此,如果需要做病毒分离,样本应该在采集后尽快接种到培养细胞。用于PCR的样本可以贮存在-20℃。用冰冻过的样本进行病毒分离大多无效,除非将含有细胞的部分贮存在-80℃的冷冻保护剂中。

六、直接检查

(一)显微镜检查

最古老的直接检查方法之一是赞克试验(Tzanck test)。在这项试验中,将细胞样本从水疱病损基底部刮下,放置于载玻片上。随后将涂

片染色，在显微镜下观察，筛选多核巨细胞，细胞中大量的嗜酸性核内包涵体即病毒衣壳，见图101-3。因为这些细胞的存在也是 HSV 和 VZV 感染的特征，用这种方法并不能特异性地诊断 VZV。VZV 可以用电子显微镜观察，但这种方法也不能明确地区分不同的疱疹病毒，见图 101-1。

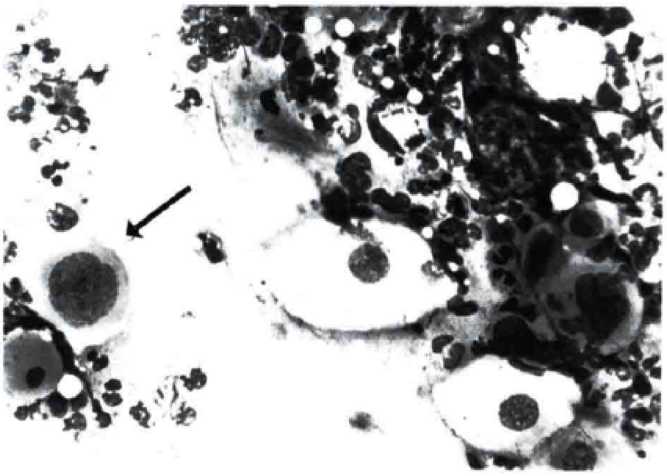


图 101-3　取自水疱病损基底部样本的吉姆萨染色。放大倍数，×102。箭头指示具有 VZV 或 HSV 特征性褶皱胞核的巨细胞

(二)抗原检测

通过直接荧光抗体检测(direct fluorescent-antibody assay，DFA)从含有细胞的水疱样本中进行 VZV 抗原检查有时仍然作为住院患者 VZV 感染的快速检测。从水疱基底部皮肤刮取获得的细胞悬液置于载玻片上，用冷丙醇固定，并干燥。然后细胞用荧光标记的单克隆抗体(MAbs)在 37℃ 湿盒中染色 30 min。洗涤后，细胞用盖玻片盖上，使用荧光显微镜观察染色情况，见图 101-4[40]。VZV 特异性单克隆抗体已有商品化供应(Merifluor，Meridian Diagnostics，Meridian Bioscience Inc.，Cincinnati，OH；Light Diagnostics，Chemicon/Merck)，以及双重 HSV/VZV 单克隆抗体混合物(SimulFlor HSV/VZV；Light Diagnostics，Chemicon/Merck)。对于从临床样本中直接检测病毒，抗原检测方法明显不如基于 PCR 方法灵敏，而且只能检测有完整细胞的样本，这限制了它的普遍适用性[41]。

(三)核酸检测

近十多年来，基于核酸(nucleic acid，NA)扩增技术，尤其是 PCR 试验，已经成为 VZV 疾病诊断的标准工具。该技术彻底改变了中枢神经系统 VZV 疾病、免疫功能不全患者播散性 VZV 感染的诊断、无典型皮疹的带状疱疹患者的识别。该分子技术的优点是仅需要少量样本、高度敏感和快速。

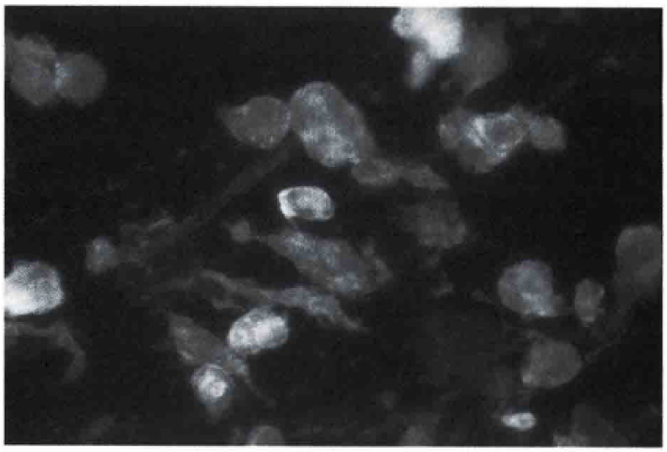


图 101-4　免疫荧光法检测来自带状疱疹患者的 VZV 阳性细胞。皮肤水疱涂片经固定，并用 VZV gE 单克隆抗体染色。放大倍数，×200，见彩插

自从第一次报道使用常规 PCR 检测脑脊液中 VZV DNA 后[42]，所用 PCR 技术已发生许多变化。更敏感并且可以定量的实时 PCR 方法(见第 5 章的综述)已经取代了原有 PCR 技术，目前在许多诊断性实验室常规使用。许多由实验室自建 PCR 试验用于扩增各种 VZV 基因片段已有发表，见表 101-1。通常没有首选的目标序列，且病毒株之间的遗传变异较低。不断增加的商品化 VZV 核酸检测试剂盒已经上市，如 VZV 示踪剂(Affigene；Cepheid)、VZV PCR 试剂盒(Abbott Laboratories)和 Artus VZV PCR 试剂盒(Qiagen)。业内也设计出同时扩增 VZV 和许多引起相似临床表现的其他病毒的试验方案。商品化市售的试验包括 Artus Herpes Virus LC-PCR 试剂盒(Qiagen；经 CE 认证在欧洲用于体外诊断，在加拿大仅用于科研，在美国尚未批准)或 HSV1 HSV2 VZV R-gene(Argene Inc.；CE 认证在欧洲用于体外诊断，在美国仅用于科研)，Lyra Direct HSV 1＋2/VZV 检测(Quidel Corp.；FDA 批准)，以及 Biofire Film Array meningitis/encephalitis panel 检测(bioMérieux；FDA 和 CE 认证)。这些多重 PCR 可在一个试管中，或能够通过单次

PCR 平行检测同时对多种具有诊断意义的重要病毒进行鉴定[43-44]。通过 PCR，VZV 的检测和定量可以在不同的临床样本中进行(表 101-2)。用于核酸检测和定量试验对照的定量 VZV DNA 已有许多生产商供应，如 Advanced Biotechnologies, Inc. (Columbia, MD)、ZeptoMetrix Corp. (Buffalo, NY)，以及国家生物标准和质控研究所(South Mimms, Hertfordshire, United Kingdom)。

表 101-2 来自不同 VZV 相关疾病患者的不同临床材料的定量 VZV DNA 结果[a]

材料	临床综合征	研究数量	PCR 阳性率(%)	病毒载量(中值，平均值或几何平均值)	病毒载量(范围)	参考文献
水疱	水痘	3		1.0×10^8 co/ml		69
	带状疱疹	3		7.4×10^8 co/ml		69
脑脊液	脑膜炎	17		4.1×10^3 co/ml	$50\sim1.7\times10^6$ co/ml	19
	脑膜炎	25		2.7×10^4 co/ml	$2\times10^3\sim5.2\times10^5$ co/ml	54
	脑膜炎	25		2.9×10^4 co/ml	$4\times10^2\sim2.7\times10^5$ co/ml	55
	脑炎	13		7.4×10^4 co/ml	$1\times10^3\sim2.6\times10^8$ co/ml	19
	脑炎	19		8.6×10^4 co/ml	$3\times10^2\sim2.1\times10^8$ co/ml	54
	脑炎	20		1.1×10^5 co/ml	$4.3\times10^3\sim2.4\times10^7$ co/ml	55
	中枢神经系统感染	16		3.1×10^3 co/ml	$1.1\times10^2\sim4\times10^4$ co/ml	56
唾液	拉姆齐-亨特综合征	25	52		$30\sim1.4\times10^6$ co/50μl	127
	无疹型面瘫	31	55		$10\sim1\times10^5$ co/50μl	127
	带状疱疹	54	100		$8\sim2.7\times10^7$ co/ml	66
全血	成人水痘	34	100	5×10^2 co/ml	$20\sim10^5$ co/ml	73
	水痘	8	87.5	1.6×10^3 co/ml	$2\times10^2\sim1.1\times10^4$ co/ml	72
	皮肤带状疱疹	9	90	2×10^2 co/ml	$10^2\sim9\times10^2$ co/ml	72
	多发皮肤带状疱疹	5	100	2.7×10^3 co/ml	$9\times10^2\sim3\times10^5$ co/ml	72
	健康对照	20	0			72
	献血者	100	0			82
外周血单个核细胞	水痘	9	100	12 co/10^5 cells		68
	水痘	19	73	4.9×10^2 co/10^5 cells	$5\sim5\times10^3$ co/10^5 cells	69
	水痘	21	48		$1.4\times10^2\sim3.4\times10^3$ co/10^5 cells	70
	带状疱疹	10	20	10 co/10^5 cells		69
	带状疱疹	71	16		$10\sim10^2$ co/10^5 cells	70
	带状疱疹	130	78	9×10^2 co/10^5 cells	$40\sim2.9\times10^4$ co/10^5 cells	74
	健康对照	28	0			69
	健康对照(50ml 血)	53	5	1.3×10^3 co/10^5 cells	$6\times10^2\sim5\times10^3$ co/10^5 cells	74
血清/血浆	水痘	18	89	2.0×10^3 co/ml	$100\sim2\times10^5$ co/ml	72
	水痘	5	100	10^4 co/ml		68
	播散性水痘	1		1.2×10^7 co/ml		80
	皮肤带状疱疹	9	67	100 co/ml		72
	多发皮肤带状疱疹	6	100	2.7×10^3 co/ml		72
	带状疱疹	9	100	1.7×10^3 co/ml	$1.8\times10^2\sim10^4$ co/ml	77

（续 表）

材料	临床综合征	研究数量	PCR 阳性率(%)	病毒载量(中值,平均值或几何平均值)	病毒载量(范围)	参考文献
	带状疱疹	12		7×10^3 co/ml	$4\times10^2\sim2\times10^5$ co/ml	76
	带状疱疹	36	78	4.3×10^2 co/ml	$<10^2\sim2\times10^6$ co/ml	78
	播散性带状疱疹	4	100	2.1×10^5 co/ml	$2.5\times10^3\sim7.4\times10^5$ co/ml	77
	内脏播散性带状疱疹	1		2×10^5 co/ml		81
	脑膜炎	35	31		$<10^2\sim6.7\times10^4$ co/ml	78
	脑炎	18	72	3.3×10^2 co/ml	$<10^2\sim1.2\times10^6$ co/ml	78
	健康对照	10	0			72
房水	急性视网膜坏死	2			$9\times10^2\sim5.5\times10^6$ co/ml	128
	前葡萄膜炎	8		2.5×10^5 co/ml	$3.8\times10^2\sim1.2\times10^7$ co/ml	85
组织	活检	17	100	9×10^3 co/10^5GC	$5.8\times10^2\sim5.5\times10^4$ co/10^5GC	17

注：[a] co. 拷贝；GC. 神经节细胞

使用 PCR 可以很容易检出水疱液和皮肤刮取物中的 VZV DNA。这有助于快速区分水疱病变是由 VZV 感染，还是由其他原因尤其是 HSV-1 或 HSV-2 感染所致。VZV PCR 对于诊断使用疫苗后发生改变的水痘疾病也有优势[41]。即使没有明显可见的水疱病变，也可通过 PCR 检测 VZV 相关面神经麻痹结痂病变[45]和皮肤刮取物的 VZV DNA[46]。容易操作和高病毒检出率使病变的皮肤成为一种理想样本，不仅可用于诊断，而且可通过基因型特异 PCR 策略对疫苗和野生型(WT)毒株进行进一步基因分型[47-48]。

用核酸扩增进行脑脊液分析已成为 VZV 相关神经系统疾病诊断的可选择方法，如小脑炎、无菌性脑膜炎和脑炎。应用 PCR 方法，发现在免疫正常和免疫受抑制患者中神经系统疾病是一个重要的且并非罕见的并发症。在临床表现为无菌性脑膜炎和(脑膜)脑炎的患者 CSF 中，VZV DNA 检出率高达 10%[49-51]。对于那些仅在 CNS 感染开始后出现的特征性水疱性皮疹，或甚至是无疹型带状疱疹病例，PCR 在分析 VZV 诱发的神经系统症状的诊断中都是有用的[19,52-54]。在所有患有 VZV 相关神经系统症状的患者中，大约有 1/4 没有出现皮疹[19,53-54]。研究发现带状疱疹相关的脑炎患者比脑膜炎患者脑脊液中的平均 VZV DNA 载量更高(图 101-5A*)[19,55]。需要 ICU 治疗的患者比不需要 ICU 的患者，CSF 平均 VZV DNA 载量更高，尽管在每个对比组中观察到了个别患者有一些重叠现象(图 101-5B)[19]。病毒主要是在临床症状出现后 1 周内检出，但在无皮疹性 VZV 诱发的神经系统症状的病例中，病毒可以在疾病的第 2 周检出[19,53]。

对水痘诱发的小脑共济失调的研究显示，病毒 DNA 数量通常较低[42,56-57]，这支持这些症状可能是抗病毒免疫应答介导的理论。抗病毒治疗开始后，在随访中发现无并发症的病例 CSF 的 VZV DNA 通常转为阴性[42]。相反，文献已发现在个别 HIV 感染患者中尽管对 VZV 进行了治疗，病毒 DNA 还是持续存在，而且这种 DNA 的持续存在与患者死亡相关[58]。

急性 VZV 相关周围面神经麻痹是 VZV 再激活过程中出现的神经性并发症，PCR 试验对其诊断具有重要作用。在拉姆齐-亨特综合征(Ramsay Hunt syndrome)病例中，不仅在耳廓和口腔的水疱中，而且在面神经鞘、中耳黏膜、脑脊液中都能检测到病毒[59]。由于疱疹多隐藏在耳部和口部，可能不明显或有延迟，只有 PCR 这样能检测到 VZV 存在的敏感试验证实相当数量的特发性周围面神经麻痹或贝尔麻痹是由 VZV 再激活所致。用 PCR 方法，可在 58% VZV 诱发的面神经麻痹患者的唾液样本中检出 VZV，其中 64%没有特征性的疱疹[60]。

*译者注：原著引用其他著作图，未经原作者授权翻译，故此保留原图

病毒能在急性周围面神经麻痹患者口咽拭子中存在12天[61]。对于唾液中VZV DNA水平高于10^4拷贝数的面神经麻痹患者，合并口咽部病变的患者比只有面神经麻痹的患者面神经功能恢复更差[61]。面神经麻痹患者的CSF样本中很少能检测到VZV[59,62]，且检出的病毒量比表现为脑膜炎和脑炎的患者要少(图101-5C)[19,54,63]。

在30%健康宇航员唾液中可检测到VZV DNA，提示亚临床再激活频繁发生[64-65]。在带状疱疹患者中，54例患者唾液中均检测到VZV DNA，包括胸部或脊椎带状疱疹患者。VZV载量介于8～2.7×10^7拷贝/ml[66]。

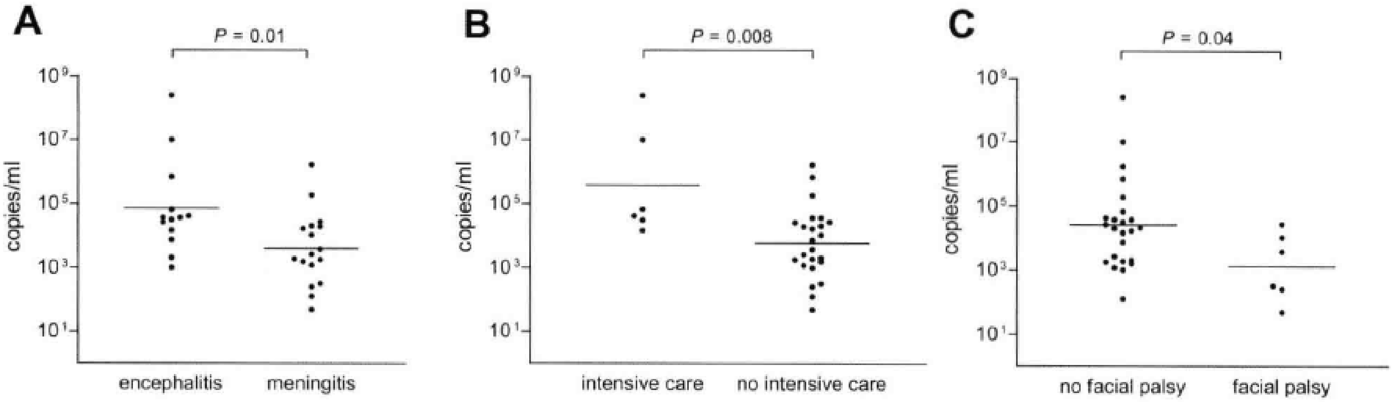


图101-5 Comparison of the amount of VZV DNA in CSF according to the neurological diagnosis (A), the severity of disease (B), and the presence of acute peripheral facial palsy with meningeal signs (C). The geometric mean values are shown by horizontal lines. The P values were calculated using the Mann-Whitney U test. (Modified from reference 19, with permission.)

VZV DNA在PBMCs[67-70]和全血[71-74]中也能检测到，尽管病毒血症被认为是细胞相关的，病毒DNA在血清和血浆中也能检测到[68,72,75-77]。用PCR可在最高达100%的急性水痘患者中检测到病毒血症，但病毒也能在带状疱疹病例的血液成分中检出。原本健康的患者出现带状疱疹后的前8天内有47%～93%血清样本可检出VZV DNA[75,78]。一项对9例免疫功能正常带状疱疹患者的小型队列研究显示，当分析血浆量增加至1 ml时，VZV DNA都呈现阳性[77]。定量分析显示PBMCs中病毒载量为5～5×10^3拷贝/10^5个细胞，全血中为20～10^5拷贝/ml，血浆或血清中为100～2×10^6拷贝/ml。急性水痘患者的病毒载量高于带状疱疹患者[72]。高病毒载量与更多的皮肤病变、更严重的病情[73]及多发性皮肤疱疹的出现[72]相关。在水痘症状出现后仅数天采集的标本中病毒载量较低[69]，在带状疱疹患者恢复期血清中现阴性[75]。当使用高敏感性的巢式PCR检测，也可以在没有皮肤病变的面神经麻痹患者的PBMCs中检测到VZV DNA[79]。在脑膜炎和脑炎患者血清中发现VZV DNA，病毒载量为50～1.2×10^6拷贝/ml，其中32例患者中有6例无皮疹[78]。

对于复杂的或临床进程不清楚的水痘或带状疱疹，特别是皮疹延迟出现或完全缺乏的病例和内脏播散的病例的诊断，血液中病毒检测是重要的[77,80-81]。在免疫功能不全患者中，定量PCR分析证实是监测疾病临床进程和评估治疗成功的重要工具[76-77,80-81]。

即使使用敏感的PCR方法，VZV在大多数健康对照者的血液中是检测不到的[82]，除非使用非常大量的血液(50 ml)[74]。在其他研究中，VZV可以在2%～3%免疫功能正常且没有VZV疾病临床表现个体的PBMC样本中检出[70,83]。这些发现支持"潜伏病毒无症状再激活可能发生，并且宿主免疫力提高可能很重要"的推测[84]。

VZV PCR可用于检测房水，研究发现这对确定VZV相关的眼部疾病是有益的。前葡萄膜炎患者的房水中病毒载量与其虹膜萎缩的程度相符[85]。

使用PCR鉴定支气管肺泡灌洗中的VZV已有报道，它对于严重VZV肺炎成功早期诊断似乎是有用的[86]。使用PCR检测组织样本中VZV DNA也是可能的，这已被用于确定VZV与先天性水痘综合征之间的联系[15,87]。一般来说，使用高灵敏的PCR技术对于确认低播散性VZV相关

病或低病毒载量相关轻症病的诊断[46,70]，或在起始抗病毒治疗后病程晚期才获得的样本的检测都是特别重要的。

七、病毒分离和鉴定

(一)细胞培养法

病毒分离为描述单VZV株的表型特征、为血清学试验如膜抗原荧光抗体(FAMA)试验[译者注:此处原文存在笔误,原文写为“fluorescent antibody-to-membrane-antibody”,应为 fluorescent antibody to membrane antigen(FAMA),译为膜抗原荧光抗体试验(FAMA试验)]提供所需的VZV感染细胞,以及为VZV药物耐药表型分析均提供了基础。许多实验室使用人包皮成纤维细胞进行临床样本的VZV分离。其他敏感的宿主细胞包括人类二倍体细胞系(最好来源于胚胎肾、胚胎肺)、人类肺癌(A549)或人黑色素瘤细胞系,以及非人类细胞系如原代猴肾细胞系[40,88]。混合细胞产品(CV-1和MRC-5)是商品化的可用于包括VZV的疱疹病毒复苏(H&V Mix;Diagnostic Hybrids,Quidel Corp)。VZV在分离培养过程中保持高度的基因稳定性。细胞培养是在37℃的无菌环境进行,所用培养基通常是Eagle最低必需培养基,在含有新霉素和谷氨酰胺的Hanks或Earle平衡盐溶液中制备,并且补充10%胎牛血清作为生长培养基和1%~2%胎牛血清作为维持培养基。培养基在56℃环境加热灭活30 min。当pH降低时说明需要更换培养液,这种更换需要每周至少完成1次。当病毒培养是用于诊断目的时,将临床标本吸附在细胞单层或直接接种于培养基中,然后将细胞置于37℃孵育,每天在显微镜下评估。细胞病变效应(cytopathic effect, CPE)的发展是多样可变的,但通常在4天最晚至2周内可见。CPE包含由变圆和肿胀细胞的小聚灶。VZV感染的确定是通过PCR或VZV特异性单克隆抗体进行单层细胞染色(下文介绍)。壳瓶离心培养可在2~5天得到结果,其敏感性比传统VZV培养更高,但比PCR低。

(二)细胞培养的病毒鉴定

在细胞培养CPE出现后,来自临床标本的VZV特异性鉴别是必需的,因为细胞培养对于区分VZV与其他疱疹病毒可能是困难的。为进行VZV特异性PCR鉴定,从培养基获取上清液,提取DNA并用于PCR。当50%的单层细胞表现出VZV的CPE现象时,单层细胞也能用VZV特异性单克隆抗体染色。为此目的,细胞单层可用磷酸盐缓冲盐水(phosphate-buffered saline,PBS)清洗。然后,将单层细胞刮下放入0.5 ml PBS中。载玻片的制备通过细胞离心直接将悬液涂于载玻片上;将载玻片风干,在冷丙醇中固定10min;然后用PBS清洗,使用VZV特异性单克隆抗体染色。经批准用于培养细胞中病毒确认的商品化试剂包括D^{3}DFA VZV检测试剂(Quidel)和上文“抗原检测”中所列出的单克隆抗体。37℃孵育30 min后,单层细胞用PBS清洗,用蒸馏水漂洗。吸去检测孔周围多余水分。染色细胞不允许干燥,否则产生人为造成的非特异荧光。用封片剂和盖玻片,染色通过荧光显微镜观察。

(三)VZV株的遗传特征

VZV基因鉴定通过不同的分子方法直接从临床标本中进行,但主要用于研究。VZV株的特征通常依靠PCR检测后的进行限制性内切酶酶切片段长度多态性分析或依靠特征性片段序列和单核苷酸多态性测定[89]。病毒分离株的基因分析已证实在同一个暴发中水痘期鉴定的VZV株是一致的,其与随后带状疱疹出现的毒株也是一致的[90]。已经有研究表明VZV株在不同地区间有变化[3,89]。

VZV株的特征性分析对于以下情况来说可能尤其重要:区分接种疫苗后野生株和Oka疫苗株,确定接种疫苗后皮疹的病原学原因,分析接种疫苗和带状疱疹发生的关系,以及评估是否发生了疫苗株病毒传播给易感人群。对于区分野生毒株和疫苗毒株的不同方法已有发表,并且在此方面,更加关注VZV ORF 62,因为多数VZV疫苗毒株的非同义突变发生在该ORF。特别是在ORF 62的SmaI和NaeI位点已被证实能够区分疫苗毒株和野生毒株,也能区分疫苗毒株和Oka亲本毒株[91]。

此外,也已经建立基于序列多态性,特别是ORF 62的实时PCR检测[48,92]。

对Oka疫苗自身的分析表明,它包含一个在R2重复区域存在差异的不同株的混合物[93]。接

种疫苗后皮疹的出现似乎与某些与 Oka 亲本株密切相关的株的出现有关[94]。

八、血清学试验

在原发感染过程中产生的 VZV 抗体是直接针对多种不同病毒蛋白的抗体，在大多数病例出现皮疹后 3 天内可以检测到。血清学试验可用于原发感染的确认，特别适用于临床不典型的病例。VZV 特异性抗体(Abs)的检测也常规用于确定免疫状态。这对于不记得患水痘史的患者可能是需要的，同时其对于移植前的评估和病毒暴露后高危个体，如实体器官或骨髓移植患者、孕妇和医护人员的水痘免疫球蛋白预防指导尤为重要。此外，尽管疫苗有效性的评估不是常规进行，但血清学试验可用于监测患者接种疫苗后的免疫状态。有多种特异性、敏感性和实用性不同的血清学方法可用于检测 VZV 特异性抗体。

(一)特异性 IgG 检测试验

许多不同的血清学试验经常是出于研究目的而在专门的或参考实验室中进行。其中之一是 FAMA 试验，被认为是血清学试验的金标准[95]，并且与对抗水痘的保护作用相关性最好[96]。一种改良版流式细胞计数检测的 FAMA 试验已经被研发出来[97]，但 FAMA 滴度并不能预测接种疫苗后的长期保护。尽管有报道在疫苗接种后血清学阳转率较高，但通常可观察到随着时间的延长，FAMA 可检出的抗体会消失[98]。FAMA 试验是费力和非自动化的。Merck 公司研发了一种非商品化的十分灵敏的酶免疫分析法(enzyme immunoassay，EIA)，它基于 VZV 糖蛋白制剂的检测，已经用于扩展疫苗接种后的血清学研究。接种疫苗后 6 周 EIA 滴度≥5 糖蛋白 EIA 单位/ml，与随后 7 年高水平的免疫突破保护具有相关性[99]。然而，研究也观察到达到该抗体水平后发生的免疫突破，这表明糖蛋白 EIA 水平与长期保护作用的关系还不甚明确。在特殊条件时使用的其他 IgG 检测方法包括抗补体免疫荧光试验、时间-分辨荧光免疫分析[100]、用于检测针对水痘中和抗体的空斑减少试验，这些试验是确定疫苗诱导的抗体实际上能中和流行的野生 VZV 株的重要工具[101]。

(二)常规诊断实验室中 IgG 检测试验

临床实验室通常使用多种不同形式的商品化的免疫分析，包括 EIA(比色法或荧光检测)、化学发光法和免疫分析法。这些试验的优点包括：①比 FAMA 试验简单易行，不需要任何额外的 VZV 细胞培养过程，可客观解释；②许多分析是自动化的，部分仪器可进行随到随做。不同的试验使用完整的 VZV 感染细胞的裂解物作为特异性抗原，或在某些情况下使用纯化的糖蛋白作为抗原，并且试验步骤依据制造商提供的方法进行。在某些实验室，非商品化、自建的 EIAs 用于常规检测 VZV 特异性抗体，多数用完整病毒裂解物作为试验抗原[100,102-104]。

商品化试验的验证通常是通过与 FAMA 试验进行比对，得到的结果显示这些方法一般不及 FAMA 试验灵敏。用 FAMA 试验或改良 FAMA 方法测得抗体阳性的自然感染个体中，有 43%～92%用商品化免疫分析可检测到抗体[105]。在特异性方面，商品化免疫检测与 FAMA 试验更接近[102]。考虑到抗体试验的目的之一通常是测定个体是否容易受感染，进而确定是否需要进行疫苗接种，商品化免疫方法由于敏感性较低而导致了更多不必要的疫苗接种。然而，这种(不必要免疫接种的)风险与被误判为有免疫力的人获得感染的风险相比是低的。免疫检测通常用于测定血中 VZV 特异性抗体，但其也可用于检测脑脊液中的抗体。

(三)IgG 亲和力试验

为了区别近期和既往感染或评价免疫抑制患者的抗体产生障碍，可能要进一步检测 VZV IgG 抗体的亲和力[106-108]。为此目的，EIA 需平行做 2 次，其中一次是用硫氰酸钠稀释液或者用二乙胺处理[106-107]。亲和力指数是通过处理样本的光密度和未处理样本的光密度的比值计算得到。处理过的样本的光密度相对于未处理过的样本越低，样本中存在的低亲和力抗体越多，这是近期感染的征象。

(四)IgM 检测

IgM 抗体的检测通常应用商品化的 EIA 试验，当水痘的临床征象不典型时，该检测可作为用

于确认原发 VZV 感染的额外方法。有时可进行回顾性检测脑脊液中的 VZV 特异性 IgM 抗体以确定中枢神经系统 VZV 感染后鞘内 VZV 抗体的产生。在 37%的带状疱疹患者发病后直至 4～5 周可检测到 VZV IgM[109]。

(五)细胞免疫力

研究显示 VZV 特异性细胞免疫是保持 VZV 潜伏状态的关键因素。T 细胞介导免疫包括 CD4 和 CD8 效应细胞及记忆细胞，能在皮疹出现后 2 周内检测到[110]。年龄增大或免疫抑制过程中观察到的细胞免疫力下降，促进了 VZV 再激活及带状疱疹的发生[111]。针对 VZV 的细胞免疫力可用 γ 干扰素酶联免疫斑点试验或用细胞内细胞因子染色后的荧光激活细胞分选分析来测定[112-114]。对于 VZV 特异性抗体阴性的患者，VZV 刺激的细胞因子的鉴定可用于评估移植受者的 VZV 特异性免疫活性[108,115]，或鉴别疫苗接种后产生的抗 VZV 保护作用[107]。但是，这些方法目前主要用于研究。

九、抗病毒药物敏感性

多数 VZV 株对抗病毒药物是完全敏感的。主要在没有高效抗逆转录病毒治疗年代的 HIV 感染个体、移植受者和血液肿瘤患者中观察到对阿昔洛韦或喷昔洛韦的耐药性。

药物耐药性的发展可能会导致患者出现不受控制的病毒扩散、内脏并发症和死亡[116-117]。体外研究和对野生株耐药研究的数据显示，阿昔洛韦耐药性多与 *VZV TK* 基因突变有关，而很少由 VZV DNA 聚合酶突变所致[118]。膦甲酸(foscarnet)和西多福韦(cidofovir)可用于阿昔洛韦耐药毒株的治疗。耐药的 VZV 株只能在特殊部位检测到，因此当进行耐药 VZV 株筛查时，患者身体所有感染部位的样本都应进行检测[119]。VZV 株的抗病毒药物敏感性可以通过表型检测来确定。大多数情况下，不同浓度的各种药物处理下的病毒株复制变化是通过人胚肺二倍体细胞的空斑减少试验来测量的。阿昔洛韦的半数(50%)有效剂量已经显示为 2.06～6.28 μm[120]。其他已经有描述的方法包括晚期抗原合成减少试验[121]和 *TK* 基因的表型特征，这个方法无须进行病毒分离[122]。表型分析有以下几点不足从而限制了其临床应用：①通常结果报告所需时间长，限制了其在临床决策中的应用；②并非所有的临床样本容易进行表型分析操作；③其敏感性不足以检测到轻度耐药的 VZV 毒株群体。因此，基因型耐药检测是临床应用的首选方法，因为该方法快速并可对不同的临床样本进行检测。基因型耐药性检测主要通过对 *VZV TK* 基因中与阿昔洛韦耐药性相关的特定区域[123]及部分聚合酶基因进行测序。迄今，已经有许多确定的 VZV 突变的报道，这些突变对不同药物的耐药性影响已有表型数据证实[124]。到目前为止，耐药性检测只在研究中进行，而不应用于常规诊断。

十、结果的评价、解释和报告

为了恰当地评价及解释试验结果，了解每个患者的临床背景资料十分重要。结果解释取决于是否怀疑为原发 VZV 感染，或该患者是否曾经患过水痘。此外重要的是，应了解患者是否有免疫受到抑制的情况。

原发感染通常依靠临床表现来诊断。利用 PCR 和抗原检测试验可在水疱标本中检测到病毒，利用 PCR 可在脓疱甚至痂表皮标本中检测到病毒。血清学试验的结果可能具有提示性，但不能用于原发感染的确定性诊断。例如，在原发感染时可观察到 IgM(单独出现或伴有低水平 IgG)，或恢复期患者血清中 4 倍增加的 IgG，然而，这些血清学反应在病毒再激活时也可检测到。

带状疱疹可以根据临床诊断，然而，当水疱局限或是在外观上与其他类型感染无明显区别时，可能需要进行确证。检测水疱液中的病毒是首选的。

在水痘期或有时在 VZV 再激活时，可通过 PCR 检测到血液中存在的 VZV。在大多数免疫功能不全的宿主中，用 PCR 检测到血液中的 VZV 通常提示病情严重。然而需要注意的是，在局部带状疱疹的 HIV 患者血液中也可检测到 VZV DNA。同样适用于检测脑脊液中的 VZV DNA，它通常被认为是一种有病理意义的发现。这 2 种临床情况通常需要立即进行抗病毒治疗。

然而，高敏病毒 DNA 检测并不总能明确病因。在继发感染和(或)是亚临床再激活时也可检

测到 VZV DNA，但随后观察其水平明显低于 VZV 疾病期的水平。由于这个原因，VZV DNA 水平的定量评估和报告具有重要意义。对于免疫功能不全的患者，迄今为止还没有确定能区别亚临床再激活与临床相关疾病或潜在致死疾病的血液 VZV DNA 阈值。然而，严重的内脏感染与血液中较高的病毒载量明显相关（表 101-2）。研究也已经显示脑脊液中的高 VZV DNA 水平可能与中枢神经系统疾病的表现及严重程度相关（图 101-5）。因此，评价并报告 VZV 中枢神经系统疾病的定量结果是有用的。在普及应用 PCR 前，脑脊液中抗体的检测并与血液抗体水平的定量比较被用于中枢神经系统 VZV 感染的诊断。检测到 IgM 抗体被认为是鞘内抗体的产生证据，正如与血-脑脊液屏障功能检测（即脑脊液白蛋白与血清白蛋白的比值）相关的脑脊液 IgG 抗体与血清 IgG 抗体的比值增加一样。在中枢神经系统 VZV 感染中，这些试验的临床意义及治疗决策的价值是有限的，因为与脑脊液 PCR 试验相比，它们只能在疾病晚期才能得出诊断，而 PCR 在疾病早期就能确定病毒的复制。然而，CSF 的血清学测试对 VZV 血管病变的检测可能有一定的价值[20-21]。

抗体检测（商品化的免疫检测是目前最常用的）的主要意义在于能够确定既往感染的个体，其指征是当 IgM 阴性时存在抗 VZV IgG 抗体。这些信息可用于指导进一步的疫苗接种决策。然而，这可能会导致血清学阳性个体接种疫苗，因为这些试验不如其他金标准方法敏感。

参考文献请扫二维码查阅

第 102 章 人巨细胞病毒

RICHARD L. HODINKA

（陶传敏 译；徐修礼、鲁炳怀 审校）

一、分类学

人巨细胞病毒（human cytome galovirus，CMV）是疱疹病毒科的一员，正式被国际病毒分类学委员会确定为人疱疹病毒 5 型（human herpesvirus 5，HHV-5）。疱疹病毒科还包括单纯疱疹病毒 1 型（HHV-1）和 2 型（HHV-2）、水痘-带状疱疹病毒（HHV-3）、EB 病毒（HHV-4）和人疱疹病毒 6、7 和 8 型。人 CMV 跟其他动物种类的巨细胞病毒一起被归类于 β 疱疹病毒亚科，依据是其靶向作用于唾液腺、细胞培养生长缓慢，以及严格的种属特性。人 CMV 是巨细胞病毒属的模式病毒种，它的命名源自被该病毒感染的细胞变大（cyto＝细胞，mega＝大）。CMV 和疱疹病毒 6 和 7 型基因组序列同源的区域已经确定，HHV-6 和 HHV-7 现在与 CMV 一起被分类在 β 疱疹病毒亚科中。

二、病原体描述

完整的 CMV 颗粒的直径为 120～200 nm，并且由含有一个大的（220～240 kb）线性双链 DNA 基因组的核心、一个 162 病毒壳粒的二十面体衣壳、一个无定形被膜或基质和一个围绕在外的富含磷脂的包膜组成。*CMV* 基因组是疱疹病毒中最大的，由 170 多个非重叠的可读框组成，编码病毒的结构蛋白和调节蛋白，以及那些作用于调节宿主免疫系统的蛋白质。CMV 的电子显微镜特征包括形态学上与其他疱疹病毒无明显区别的病毒体（virion）、大比例的缺陷病毒颗粒（viral particles），以及被称作致密体（dense bodies）的球形颗粒。病毒复制发生在宿主细胞的细胞核内，涉及了即刻早期（immediate early，α）、早期（early，β）和晚期（late，γ）3 种基因的表达。当组装完成的核衣壳从细胞核膜的内表面出芽后形成病毒的包膜。

分子和免疫学技术，包括对临床样本直接进行全基因组测序[1]，已被用于研究 CMV 毒株的变异。研究表明，虽然不同 CMV 毒株与实验室标准毒株 AD-169 和 Towne 具有 95％的同源性，在病毒基因组多个编码区与非编码区呈现多态性的不同基因型的 CMV 毒株在不同人类宿主中已经得到确认，包括健康成人和儿童、先天感染婴儿、移植受者和 AIDS 患者[1-3]。在单个个体内部和个体之间观察到了毒株的多样性，毒株的多样性与地理分布、传播、组织嗜性、免疫发病机制和疾病的临床表现等特定差异具有相关性，但 *CMV* 基因型在感染和疾病中的确切作用和重要性并不清楚，且很大程度上仍然未知。

CMV 可被很多物理或化学处理方式灭活，包括热（56℃，30 min）、低 pH、脂溶剂、紫外线和反复冻融。

三、流行病学和传播

CMV 呈世界性分布，各年龄段均可感染，传播无季节性或流行特性。CMV 血清学阳性率在所有人群中都随着年龄增加而增加，波动范围为 40％～100％；在居住条件拥挤的低收入社会经济群体中病毒感染的时间更早而且流行率也最高。CMV 可垂直和水平传播，感染被分类为出生前（先天性）感染，在分娩中感染（围产期），或出生后（产后）感染。CMV 感染高风险的群体包括儿童保育员、孕妇、宫内感染的婴儿、极低体重和早产儿（出生体重＜1500 g 和胎龄＜30 周），以及免疫

系统受损的个体。

大多数感染是通过与病毒排出者的密切接触而获得的。由于CMV可在多种体液中检出,包括唾液、尿、乳汁、眼泪、粪便、阴道和子宫颈分泌物、血液和精液,因此确定其可以通过多种不同的途径传播。在先天性或获得性CMV感染后,长时间排出病毒有利于病毒的扩散。在一次原发感染后,病毒可以排出数周、数月,甚至数年。

胎儿通过胎盘感染可在孕妇的原发性或复发性感染后发生,但在原发性母体感染时,CMV传播给胎儿的风险和有症状性胎儿感染的概率更高。如果感染发生在妊娠期的头12～16周,胎儿损伤发生率是最高的。母亲的疾病可轻微,伴发热和非特异性症状,但在大多数孕妇中临床表现并不明显。新生儿也可在分娩过程中通过与产道的病毒接触而感染。近10%的女性在分娩或邻近分娩时从生殖道排出CMV,并且病毒被传播给约50%的新生儿。这些婴儿在3～12周龄时开始排出病毒,但通常无临床症状。通过母乳的CMV母-婴传播很常见,极低体重早产儿发生疾病的风险最大。在入日托的幼童和刚学走路就入托的孩子中,有20%～70%儿童在1～2年内感染CMV。孩子们感染CMV后一般无症状,但可将CMV传播给他们的父母和其他看护者,如果孕妇被传染,就会增加传播给胎儿的风险。易感的健康护理人员和日托机构的员工有职业暴露的危险。在青少年和成人,CMV可经性传播,这是CMV传播的一种重要途径。

与其他疱疹病毒感染类似,CMV原发性感染可以导致终身持续性或潜伏感染。在应对不同的刺激反应时,特别是免疫反应受到抑制时,可出现病毒再激活。潜伏感染部位被认为包括各种组织、内皮细胞和白细胞。因此,CMV可以通过输注血液制品和移植期间暴露于组织和造血干细胞时进行传播,并可能导致极低体重婴儿、孕妇、移植受者和其他免疫功能不全宿主,以及免疫正常的危重患者出现严重疾病。

四、临床意义

在原本健康的儿童和成年人中,CMV感染常见,通常无症状,然而,在新生儿和免疫功能不全宿主的疾病发病率与疾病谱证实此病毒作为一种重要的人类病原体[4-5]。

(一)免疫功能正常的宿主

绝大多数出生后获得性CMV感染的免疫功能正常的儿童和成年人无临床症状。细胞免疫对控制感染是最重要的,而CMV特异$CD4^+$和$CD8^+$淋巴细胞扮演了关键角色。

年轻人的CMV感染症状与EB病毒引起的传染性单核细胞增多症相似,包括持续发热(持续2～3周)、全身乏力、异型淋巴细胞增多和不产生嗜异性抗体的轻度肝炎。与CMV相关的传染性单核细胞增多症通常无渗出性咽炎,淋巴结肿大和脾大不常见。发生在免疫功能正常宿主的器官特异性疾病,包括结肠炎、肝炎、脑炎、肺炎、前葡萄膜炎和伴不明原因发热的多系统损害已有报道,但是罕见。

有人提出免疫功能正常的宿主CMV感染与其他临床疾病存在联系,包括动脉粥样硬化、高血压、恶性肿瘤如胶质母细胞瘤和乳腺癌、新发糖尿病、炎症和自身免疫疾病、阿尔茨海默症和老年人的免疫衰退。目前,尚不清楚CMV究竟是导致这些疾病的真正原因或是无辜的"旁观者"。最近,越来越多的报告指出重症CMV感染与免疫功能正常的危重疾病住院患者预后差相关[6-7]。CMV的再激活在这些患者中常见,而且与在医院和(或)重症监护病房住院时间延长、机械通气时间增加、严重脓毒症、疾病严重程度高和死亡率增加[8]有关联。

(二)胎儿和新生儿

从0.2%～2.5%的新生儿中可检测到CMV感染,是最常见的、确定的先天性感染病因。10%～15%的先天性感染的婴儿在新生儿期出现症状,可能的临床表现从严重的疾病伴有以下症状的任何组合,如胎儿宫内发育迟缓、黄疸、肝脾肿大、瘀点、血小板减少性紫癜、心肌炎、肺炎、小头畸形、脑室周围钙化、中枢神经系统异常、耳聋和脉络膜视网膜炎,甚至其他更局限的损害。有症状的新生儿在出生最初1个月内可能死于并发症,更为常见的是,尽管他们存活下来了,但其具有神经系统受损并伴有长期的健康问题,例如,感音神经性耳聋(先天性CMV感染的最常见慢性病)、视力损害、癫痫发作、或精神运动和(或)智力

残疾。现在人们认识到，即使那些出生时无症状的先天性感染的婴儿在以后的人生中可以发展为进行性的听力丧失。

围产期或产后CMV感染可发生于足月儿和早产儿，是由于分娩时暴露于母体子宫颈分泌物、出生后摄入乳汁，或者输血所致。在高风险的早产儿中发病率和死亡率可能非常显著，有报道肝脾肿大、中性粒细胞减少、血小板减少、异型性淋巴细胞增多、溶血性贫血、肺炎和坏死性小肠结肠炎的发生。

尽管在发达国家大部分先天性CMV感染是源于母体的原发性感染，在资源贫乏地区的研究表明母体的原发或再激活的CMV感染后遗症的发生率与发达国家相似，尤其是听力损失[5]。因此，与原来观念相反的是，母亲先前存在的感染和CMV抗体的产生也可能无法消除婴儿出现重大感染（译者注：即会引起症状和后遗症的感染）的风险。迄今为止，似乎围产期或出生后感染的婴儿不进展为感染后迟发的神经后遗症。

(三)免疫功能不全的宿主

在先天性或获得性细胞免疫缺陷的儿童或成人，如AIDS患者、癌症患者（特别是那些接受化疗的白血病和淋巴瘤患者），以及实体器官和造血干细胞移植的受者，CMV感染常见且有时较为严重。这些患者的感染可能是由于潜伏病毒的再激活或原发感染，或通过输血或移植的器官引入外源性病毒的再感染所造成。在原发感染后往往症状最为严重；然而再激活感染或重新感染也可能引起重度免疫功能不全宿主的严重疾病。

CMV是移植过程中最常见的病毒感染，20%～60%移植受者在移植后一年内出现有症状感染。在器官移植受者中CMV感染的发生率和严重程度是可变的，这取决于移植的类型、供者器官的来源、受者的免疫状态和免疫抑制治疗的持续时间[9-10]。最常出现的CMV疾病见于接受CMV血清学阳性供者移植器官的CMV血清学阴性受者。活动性感染通常发生在移植后1～4个月，此时患者的免疫抑制水平达到峰值。用于器官移植后预防性或先发治疗的广泛使用的抗病毒药物已经造成了迟发性（移植术后>90天）CMV疾病的发生[11]。这些患者的主要症状表现为非特异性“病毒综合征”，通常包括发热、全身乏力、嗜睡、肌痛或关节痛、白细胞减少、血小板减少和肝炎。具体包括：①特定器官损害可导致肺或者心脏-肺移植受者的肺炎；②心脏移植后的心肌炎、视网膜炎，或加速血管损伤和动脉粥样硬化的发生；③肝和胰腺移植受者分别发生肝炎和胰腺炎；④胃肠道疾病。移植受者的CMV感染也与延迟或失败的骨髓移植，移植物抗宿主病的发病率或严重程度的增加，以及实体器官移植时移植排斥反应的风险增加相关。各种并发症，包括细菌和真菌的重叠感染可导致死亡的发生。CMV感染，特别是与肺炎相关的感染，是造血干细胞移植后的发病率和死亡率的重要原因。

对于HIV感染者，活动性CMV感染的发生通常伴随免疫抑制加重（如$CD4^+$淋巴细胞计数下降到50～100细胞/μl以下），并且主要由潜伏感染再激活引起。视网膜炎是最常见的临床表现，未经治疗或免疫系统无改善的情况下会出现视网膜的破坏和视神经的损伤。CMV也是引起发热、包括食管炎、胃炎和溃疡性结肠炎的胃肠道感染、脑炎和多发性神经根脊髓病的重要原因。CMV肺炎在HIV感染的情况中并不常见。在采用高效抗逆转录病毒疗法的AIDS患者中，严重CMV疾病已有显著减少[12]。

(四)治疗和预防

多年来，4种抗病毒药物已经被美国FDA批准用于治疗和预防CMV感染，包括更昔洛韦(ganciclovir)及其前体药缬更昔洛韦(valganciclovir)、膦甲酸(foscarnet)和西多福韦(cidofovir)[9-10,13]。这些药物靶向作用于病毒DNA聚合酶并影响病毒DNA复制。初始治疗药物选择更昔洛韦，尽管缬更昔洛韦现在也广泛用于先发、根治和维持治疗或移植受者的预防性治疗，基于其具有较更昔洛韦更好的生物利用率。这2种药物都可以通过口服或静脉注射给药。膦甲酸和西多福韦被认为是二线治疗药物，主要用于伴有CMV视网膜炎的AIDS患者，膦甲酸也用于治疗更昔洛韦耐药的CMV。所有4种药物都具有明显的药物相关毒性，并会随着时间出现耐药性。使用更昔洛韦和缬更昔洛韦治疗可使先天性或围产期CMV感染的新生儿受益，但临床经验有限，需要进一步的临床验证。很少建议免疫功能正常成人使用抗病毒药物治疗CMV感染，并且还需要在伴有CMV

感染的住院、重症免疫功能正常患者中进行进一步研究以确定治疗是否有益。CMV免疫球蛋白已经被FDA批准，并与抗病毒药物联合治疗和预防器官移植后的感染。

已开发的新治疗方法，包括莱特莫韦（letermovir，CMV UL56末端酶抑制剂）、马立巴韦（maribavir，CMV UL97激酶的口服抑制剂）和博瑞西多福韦（brincidofovir，西多福韦的口服衍生物），这些药物已经被证明比现有针对CMV的抗病毒药物更有效且毒性更低[14-15]。莱特莫韦最近被FDA批准作为一种口服药物，用于CMV血清学阳性成人受者接受异基因造血干细胞移植时CMV感染和疾病的预防，未见重大不良反应的报道[16-17]。马立巴韦和博瑞西多福韦已经被成功用于治疗更昔洛韦耐药的CMV感染，然而这2种药物在Ⅲ期试验中都没有显示出在异基因造血干细胞移植受者预防性使用的有效性。几种抗CMV活性药物被赋予新的用途用于多重耐药或难治性CMV感染的辅助治疗，包括①来氟米特（leflunomide），批准用于类风湿关节炎的治疗；②青蒿琥酯（attesunate），一种抗疟药；③西罗莫司和依维莫司，用于防止移植排斥反应的雷帕霉素类药物。这些药物的疗效仍有待临床试验验证。

最近，涉及CMV血清学阳性移植供者来源的CMV反应性细胞毒性T淋巴细胞的细胞过继性免疫治疗已经成熟，并作为一种新的治疗方法用于实体器官或造血干细胞移植后恢复免疫能力和现有方法治疗无效的CMV感染的治疗[18-22]。来自第三方供者的CMV特异性T细胞过继性转移也显示出希望，因而建立了冷藏保存第三方供者的T细胞库，用于难治性感染的现成治疗[23]。这一治疗方式的疗效有待临床试验验证。

目前，尚无批准上市的疫苗可用于预防CMV感染。一些候选疫苗已经开发，并处于在临床前和临床评价的各个阶段[24-26]。它们包括来源于减毒病毒或复制缺陷病毒或无感染性颗粒的制剂、重组亚单位疫苗和DNA/RNA或病毒载体基因疫苗。这些疫苗的安全性和免疫原性已经在Ⅰ期临床试验中得到证实，Ⅱ期试验展现了一种佐剂重组表面糖蛋白B疫苗即gB/MF59，以及一种包含质粒编码磷蛋白65和糖蛋白B的DNA疫苗即ASP0113的良好前景。目前ASP0113疫苗正处于Ⅲ期试验。

无症状的CMV排毒很常见，而标准预防措施和良好的个人卫生规范（如仔细洗手）可以帮助减少传播的可能性。常见含乙醇、洗涤剂、氯的消毒剂能有效灭活病毒。经输血或通过母乳的CMV传播可以通过使用去白细胞和（或）CMV血清学阴性的血液制品，或巴氏消毒、冻融、短波紫外照射处理母乳来达到最小化。

五、标本的采集、运输和储存

目前，有多种方法可用于CMV感染患者的诊断和管理（表102-1）。这些包括细胞培养病毒分离、组织学和细胞学技术、病毒蛋白或核酸的直接检测法和（或）定量检测法、血清学试验、表型和基因型分析来筛选抗病毒耐药性，以及测定宿主的细胞免疫功能和CMV感染控制的试验。操作方法和标本类型的选择取决于患者群体、临床状况及每个试验的预期用途。样品采集和处理的详细介绍请参见第79章。

表102-1 诊断和监测CMV感染的实验室方法

方法	原理	样本	检测时间	敏感性	特异性	临床应用
病毒分离						
传统试管培养法	病毒在培养细胞中生长并形成CPE	各种体液和组织	2～4周	低-中	高	缓慢、需要大量时间、人力和资源；目前诊断效能受限；用于表型敏感试验的病毒分离
旋转扩增壳瓶培养法	病毒在培养细胞中生长出现CPE之前进行抗原检测	各种体液和组织	16～24 h	低-中	高	用于诊断CMV感染比试管培养更快速和更灵敏；在一些实验室的使用受限；通常首选分子检测
直接检查						
组织病理学或免疫组织化学	CMV感染细胞的组织学检测	组织	24～48 h	低-中	中-高	最有助于组织侵袭性疾病的明确诊断；使用CMV特异性免疫组化染色联合组织病理学以提高敏感性

（续 表）

方法	原理	样本	检测时间	敏感性	特异性	临床应用
抗原检测（抗原血症检测）	免疫细胞化学检测白细胞中 pp65 蛋白	外周全血白细胞	2～5 h	中-高	中-高	快速，操作相对简单；依靠主观解释且缺乏标准化；用于临床疾病诊断、启动先发治疗和监测治疗应答的半定量检测
核酸检测	定性和定量实时 PCR；数字 PCR	定性 PCR：各种体液和组织 定量 PCR：血浆、全血 数字 PCR：血浆	1～3 h	高	高	优异的性能特征和标准材料；定性检测敏感性高，但无法区分活动性疾病与感染或潜伏；定量检测现在被认为是最好的检测方法，可以快速、准确诊断 CMV 疾病，识别有发病风险的患者，评价疾病进展和复发风险，直接启动先发治疗，监测治疗应答，以及预测病毒耐药和治疗失败；数字 PCR 提供无需标准或校准曲线的定量检测
血清学	检测 IgM 和 IgG 抗体及 IgG 亲和力	血清	1～2 h	中-高	中-高	操作快速简便；检测 CMV 特异性 IgM 或血清学从阴性到阳性转换的 IgG 抗体，有助于诊断新近或活动性原发 CMV 感染；筛查血液或器官供者和受者的抗 CMV IgG 对防止 CMV 向高风险个体传播是重要的；检测 CMV IgG 亲和力有助于区分孕妇的原发性和非原发 CMV 感染
细胞介导免疫检测	检测暴露于 CMV 特异性蛋白和（或）多肽抗原表位的 T 淋巴细胞的 γ 干扰素释放	外周全血淋巴细胞	16～24 h	中	中-高	评价 CMV 特异性免疫应答和重建；可能有助于病毒血症和疾病的危险分层，以及指导免疫功能不全宿主（如移植受者）的治疗和其他管理决策；有几种可供商业化使用的试验
抗病毒药物敏感性试验						
表型检测	检测不同浓度抗病毒药物对细胞培养中病毒复制的抑制情况	病毒分离株	2～6 周	中-高	高	直接检测药物对病毒生长的影响；能够识别新的耐药突变和测定抑制病毒所需的药物量；操作繁琐、费力，以及无法在临床相关时间范围内提供结果；不实用
基因型分析	PCR 及扩增产物的测序或直接测序	血浆、全血、其他体液和组织	24～48 h	高	高	快速检测导致一个或多个现有的抗 CMV 药物耐药的已知基因突变；能极大地影响初始和替代治疗的选择，并能预测治疗失败和确定对多种药物的潜在交叉耐药；除非使用二代深度测序技术，否则耐药病毒总体的 20%～30%以下可能无法检出；主要在参考和商业实验室提供
基因型测定	PCR 及扩增产物的测序或直接测序	各种体液、组织	24～48 h	高	高	CMV 毒株间遗传多样性的特征和免疫功能不全宿主的多种和混合基因型的鉴定，可能有利于预测在活动性 CMV 感染治疗期间疾病严重程度和病毒清除的动力学；方法主要是调查性的

（一）用于直接检测的标本

组织标本、呼吸道分泌物（如唾液和支气管肺泡灌洗液）、尿沉渣、脑脊液（cerebrospinal fluid，CSF）、外周全血、血浆、脐带血、羊水、房水和玻璃体液和外周血白细胞均可用于不同患者群体 CMV 抗原或核酸的直接检测。

血液样本已被证明对于免疫功能不全宿主 CMV 疾病的识别和监测最有效。纯化的血白细胞可被用于 CMV 抗原血症的检测，而全血、从抗凝全血获得的血浆、从凝集的血液获得的血清和纯化的外周血白细胞已用于分子扩增分析定量检测 CMV DNA。EDTA 是目前用于分子检测的首选抗凝剂，因为它被认为是血液中核酸的最有效

的稳定剂。针对不同患者人群的血液采集的最佳频率仍有待确定，虽然通常的做法在先发抗病毒治疗期间监测病毒载量是每周采集一次血液标本[9-10]。首次样本应该在治疗开始前采集，以建立基线病毒载量[27]。

有较大争论的是哪种血液成分最适合于CMV DNA检测[28-30]。虽然过去通常使用外周血白细胞，现在认为全血和血浆是首选的标本[31]。全血已被证明是所有经检测的血液成分中CMV DNA检测浓度最高和检出率最高及检出时间最早的样本[28]，还可能代表实验室用于CMV疾病的诊断和监测的最实用标本，因为它在提取DNA之前仅需要很少的处理，而且可以检测细胞结合的和细胞外的病毒。在处理全血时，应考虑提取平台和化学成分的选择，因为CMV DNA的产量可能有所不同，这取决于所选用的核酸分离方案。另外，样品制备的延迟可能导致血液采集后白细胞的裂解，这样不管是采用纯化的白细胞还是血浆作为标本来源都会导致CMV DNA定量的不准确[32]。用全血标本来检测的潜在局限性是不同患者白细胞计数可能不同，如果未将细胞计数的波动考虑在内，这可能会导致错误的定量检测结果。此外，在全血中检出低水平CMV DNA可能并不总是与活动性CMV疾病相关，全血中持续的DNA血症可能导致过度治疗，直至结果转阴或低于预测临床应答的阈值。对于粒细胞缺乏患者，由于无足够数量的白细胞用于检测，血浆可能是首选标本，并且可能是用以预测CMV疾病更好的标本来源。在治疗的第21天，血浆DNA血症也可能是比全血DNA血症更好的复发预测指标[31]。当对患者进行长期监测时，应当使用同一标本类型以使不同血液成分之间所测得的变异最小化。

对于CMV抗原血症的检测，一般建议采集总量为4～7 ml全血，但对于严重的粒细胞缺乏的患者可能至少需要10 ml血(例如，中性粒细胞绝对计数<200个/mm^3)。可以使用各种类型抗凝血，包括肝素、EDTA、柠檬酸钠或酸式柠檬酸盐右旋葡萄糖抗凝血，尽管使用肝素或EDTA抗凝血的经验最为丰富。血液标本应在4℃储存或运输，为了获得准确而可靠的病毒载量应在采集6～8 h内处理，定性检测应在24 h内进行并且不得超过48 h[33]。有研究表明在血液标本储存24～48 h后抗原血症的定量水平将降低，尽管在这段时间内放置4℃时多数阳性样本仍然呈阳性[33-35]。作为一般规则，用以分子扩增的标本采集后应立即储存在4℃，然后立即送到实验室处理。已证实将全血在4℃储存时CMV DNA可稳定长达14天，当从全血中分离出血浆后CMV DNA可在4℃下稳定长达21天[35-36]。这些发现在广泛的DNA浓度范围中都保持一致。处理后的样本应按单次使用量，分装在多个冷冻管中供检测和储存。通过这种方式的处理，样本不会反复冻融，且不返回到原来的样本冷冻管，从而避免了DNA降解及样本交叉污染。如不能立即检测，样品应及时冷冻并储存在−70℃或更低温度。

对于先天性CMV感染的产前诊断，羊水的采集已经在很大程度上取代了绒毛膜绒毛取样或脐静脉穿刺采集胎儿的血液。应在妊娠21～23周和估计母体感染至少6～8周后进行羊水采集具有最佳的敏感性[37-38]。已报道出生时采集新生儿血液，在纸片(如Guthrie卡)上干燥的血斑已用于在新生儿筛查和新生儿期以后临床怀疑先天性CMV感染患者的回顾性诊断[39]。然而，在新生儿筛查方面，干血斑和血液通常不如尿或唾液敏感。干血斑也已用于先天感染新生儿的CMV毒株快速基因分型[40]和实体器官移植受者的CMV DNA定量[41]。液态和干燥的唾液标本都已被证实可用于新生儿CMV DNA检测，较为敏感且特异[42]。用于诊断新生儿的先天性感染时，应使用出生后3周内收集的唾液、尿，或同时使用2种标本[38]。唾液样本(而不是尿)现在被认为是最方便收集的样本类型，并被证实在检测CMV DNA用于有效筛查新生儿先天性CMV感染和感音神经性耳聋时和尿一样可靠。

印模涂片、冰冻切片、甲醛固定和石蜡包埋的材料可用于组织标本的原位杂交、免疫组织化学染色或者组织病理学检测，这些标本是取自于肺炎、胃肠道疾病、肝炎、心肌炎、视网膜炎、胰腺炎、肾炎、膀胱炎、中枢神经系统疾病的患者。

最近，检测支气管肺泡灌洗液中的CMV DNA病毒载量已经被证明可用于实体器官和造血干细胞移植受者、疑似CMV感染婴儿和无需侵入性操作获取肺组织的疾病的CMV肺炎诊断[43-45]。

(二)用于病毒分离的标本

CMV可从多种不同的体液和组织中分离;然而,尿、呼吸道分泌物(如唾液、咽漱液和支气管肺泡灌洗液)和抗凝全血(白细胞)最常用于诊断。

尿标本应当是清洁尿标本。因为尿中CMV的排出是间歇性的,通过处理多个标本可能增加病毒分离率。推荐用0.1N NaOH或0.1N HCl将尿标本pH值调整至7.0,以减少对细胞培养的毒性作用。有推荐使用离心尿获得富集的沉积物,但通常不必要,离心尿可能会比非离心尿样本更加频繁地产生毒性。

血液白细胞培养已被用于免疫功能不全患者的评价。尽管血标本分离培养病毒的敏感性不能与分子方法或抗原血症检测相媲美,但与尿或呼吸道分泌物中排出病毒的检测相比,白细胞中检出CMV通常是提示有症状CMV感染的较好指标。可以使用新鲜采集的肝素、柠檬酸钠、酸式柠檬酸盐右旋葡萄糖或EDTA抗凝血液。已报道有许多获得外周血白细胞的方法。然而,用Ficoll-Hypaque或甲泛影钠和右旋糖酐500混合物的密度梯度离心最适合临床实验室。在单一操作步骤内即可将单核细胞和粒细胞与红细胞有效分离。该过程快速简便,所用试剂均有市售。与传统的沉淀法相比,该技术能分离出更多的病毒量,增加感染灶和蚀斑的产生。尽管已观察到伴随着直接红细胞裂解分离培养CMV的能力下降,以下描述的直接裂解方法可以替代密度梯度离心。

支气管冲洗液、组织活检和尸检标本,特别是肺、肾、脾、肝、脑、胃肠道和视网膜,也可以被用于病毒分离。从组织中分离到CMV是器官受累的强有力证据。所有组织标本采集后应立即放置在一个合适的病毒运输培养基中。

因为当CMV受到冻融时会失去感染性,要进行病毒分离的标本应在冰水浴或冰箱中保持4℃,直到它们可被用于接种培养物,最好在采集后几个小时内完成接种。当较长的运输时间不可避免时,在4℃保存不超过48 h还可以适度保持其感染性。在一般情况下,用于CMV分离的标本不应在室温放置,为了保持病毒活性,标本采集后应尽快运送到实验室。如需要冻存标本,在标本中添加等体积的0.4 M的蔗糖磷酸盐溶液有助于维持病毒的感染性。所有冷冻标本应储存在-70℃或更低温度,或在液氮中。如果标本储存在-20℃,病毒感染性会丧失。

所有标本在细胞培养接种前应当使用抗生素处理。

(三)用于血清学试验的标本

用于免疫球蛋白G(IgG)抗体检测的单份血清标本有助于提供CMV既往感染的证据和发现存在CMV感染风险的个体。这种方法尤其适用于移植前移植器官的供体和受者,以及用于早产儿和骨髓移植患者的血液制品捐献者的血清检测。通过了解妇女在受孕前的免疫状态可能帮助鉴别妊娠后原发CMV感染最易感的个体。

对于近期CMV感染的血清学诊断,单份血清样本的IgM检测即可,或者采集至少相隔2周的双份血清做IgG抗体检测。急性期血清样本应当于发病后尽快采集,与恢复期的血清样本同时检测。如果怀疑是先天性感染,要提供来自于母亲、胎儿和新生儿标本进行IgG和IgM抗体检测,以确定产前、分娩期和产后感染。当检测胎儿的IgM时,血液标本应在妊娠22周后采集,因为在妊娠20周胎儿开始合成抗体,而且可能在1～2周时间达不到检测水平。

处理的血清样本可以储存于2～8℃数天直至检测完成,或者为了更长时间可冷冻储存于-20℃或更低温度。应当避免反复冻融,而且标本不应储存在无霜冰箱中。

之前曾建议将唾液或口腔分泌物中CMV特异性抗体检测作为儿童血液采集的一种非侵入性的替代选择,尽管在这种情况下两者都没有被常规使用。对于CMV所致神经系统疾病患者,如果脑脊液与血清一并在相同或相近日期采集,则该份脑脊液可以用于病毒抗体的检测。然而,脑脊液抗体的检出率低,并且因鞘内病毒特异性抗体的产生延迟和通过受损的血-脑脊液屏障被动转移的血清抗体使其应用受限。一般而言,用于诊断先天性CMV感染的CMV特异性IgG和(或)IgM抗体筛查,以及用于诊断CMV神经系统疾病的脑脊液抗体检测,由于其应用受限,在很大程度上已被更直接的方法如PCR所取代。

(四)用于测定细胞介导免疫的标本

肝素锂或肝素钠抗凝全血可用于测定针对

CMV感染的细胞介导免疫反应[46-48]。对于酶联免疫斑点(ELISPOT)测试，通常使用总量7.5～12.0 ml的全血，按照已建立的流程纯化外周血单个核细胞(PBMCs)，然后，在37℃应用规定的CMV抗原刺激细胞16～20 h。将细胞数量调节到$(2.0～2.5)\times10^5$/反应用于试验。对于QuantiFERON-CMV试验，采集总量1.0 ml全血到3个试管中，其内壁上已分别包被了干燥CMV抗原、植物血凝素(一种有丝分裂原，作为阳性对照的)、肝素(作为阴性对照)。剧烈震荡5 s以充分混匀血液，确保每个试管的整个内壁都已覆盖血液，然后立即置于37℃下16～24 h以刺激细胞，然后离心分离获得待检测的血浆。血浆标本在检测之前可以储存在2～8℃长达4周，或者在－20℃或更低温度可以保存更久。对于采用细胞内细胞因子染色或携带抗原特异性受体T淋巴细胞染色的流式细胞术来测定免疫细胞功能分析的试验，可以使用全血或纯化的PBMCs。在检测中，共需要2～3 ml全血用于测定刺激后$CD4^+$ T细胞内的ATP合成。

六、直接检查

组织病理学检测，抗原血症测定，以及定性和定量的分子生物学方法已被常规用于临床标本中CMV的直接检测。组织活检标本的组织学或免疫组化染色对于局部的CMV组织侵袭性疾病的诊断是最有用的，而抗原血症检测和分子扩增试验目前是检测和监测严重CMV疾病高风险患者，诊断活动性CMV疾病和监测治疗疗效的标准[10,49-50]。

(一)组织病理学检测

用瑞氏-姬姆萨(Wright-Giemsa)染色、苏木素和伊红染色或巴氏染色对常规切片的CMV感染的活检或尸检组织标本染色时，可以发现具有嗜碱性的核内包涵体的特征性大细胞(巨细胞)，偶尔可以看到嗜酸性的胞质内包涵体(图102-1)。核内包涵体有“猫头鹰眼”的外形，因为它有边集染色质，其通常被清晰的延伸到核膜的清晰光晕包围。在组织病理学中出现特征性细胞学的改变可以提示CMV感染，虽然其敏感性不如分子生物学方法，如PCR方法，但组织病理学改变能更好预测疾病，尤其是胃肠道疾病，并且大多数情况下与活动性疾病相关。总体而言，CMV疾病的组织病理诊断费时费力，而且相对不敏感，因为CMV可以感染组织但不产生形态学变化，未能找到典型巨细胞并不能排除CMV感染的可能性，所以建议进行额外的病毒学或血清学确证检测。

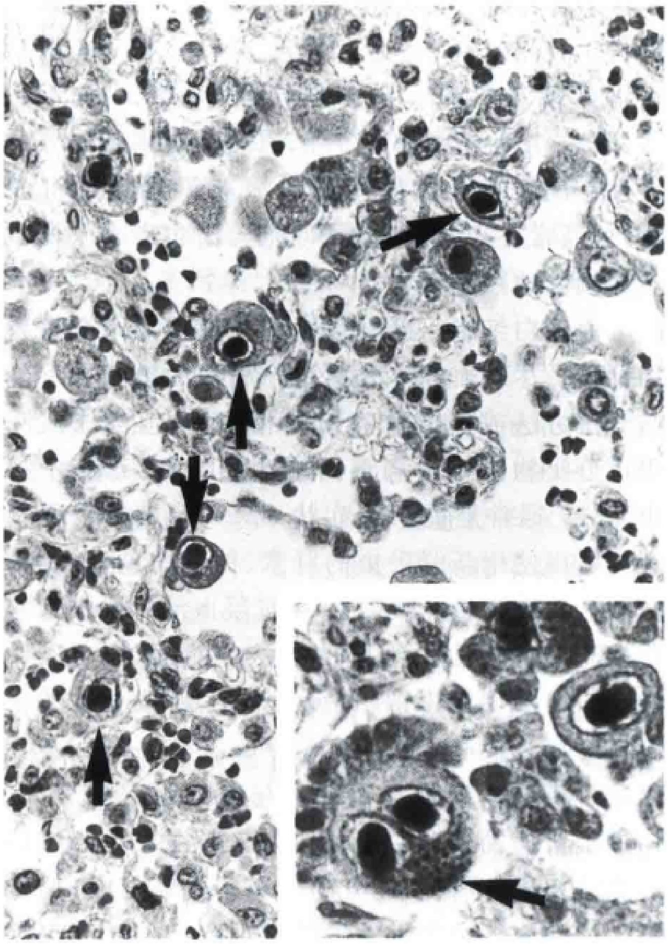


图102-1 来自于间质性肺炎患者的肺组织的固定后苏木素-伊红染色。注意许多具有较大细胞内包涵体的巨大细胞，被特征性清晰光晕(箭头)所围绕。细胞质中也可存在不太明显的颗粒状包涵体(插图)(Eduardo Ruchelli供图)

通过使用CMV特异性的单克隆或多克隆抗体进行免疫组化染色检测CMV抗原，或使用CMV特异性DNA探针进行原位杂交检测CMV核酸，可以提高组织病理学检测的敏感性和特异性。多年来，通过免疫组化检测肠黏膜上皮或肺组织中的CMV已经被认为是评价具有胃肠道症状或肺炎的实体器官和造血干细胞移植受者的重要部分，特别是考虑到这些临床疾病中血液病毒载量可能检测不到或很低。CMV组织学诊断的主要障碍是需要进行侵入性操作以获取活检样本。因此，并非总能获得组织活检样本，通过抗原或核酸检测发现血液中CMV通常

作为替代检测方法，为临床怀疑的组织侵袭性疾病提供支持。

(二)抗原检测

CMV 抗原血症检测是一种早期诊断 CMV 感染的敏感、特异和快速的方法，可用于常规监测具有严重 CMV 疾病的高风险患者，包括实体器官和造血干细胞移植受者、HIV 感染患者及免疫抑制剂治疗患者。实验操作相对简单，基于免疫细胞化学法检测外周血白细胞胞核内的 65 kDa 低基质磷蛋白质(pp65)。通过使用这种方法，可在症状发作前检测到 CMV，并且可以通过病毒载量定量，以帮助预测 CMV 疾病，还可以与无症状感染鉴别[51-52]。该方法也被用于评价抗病毒疗法的有效性、预测治疗失败及病毒耐药的发生[53-54]，促使采取先发治疗[55-56]，对有中枢神经系统感染的 AIDS 患者进行脑脊液白细胞 CMV 检测，以及对于先天性 CMV 感染、CMV 胃肠疾病、肺炎、肝病和免疫功能正常宿主的 CMV 感染进行诊断。阳性抗原血症结果对考虑诊断组织侵袭性疾病是有价值的，但由于该技术相对较低的敏感性，阴性结果在这种情况下没有帮助。pp65 蛋白也已在免疫功能不全患者的血液中循环的内皮细胞中发现，而一些研究者已表明这些细胞的感染与器官的受累和进展的疾病相关[57-58]。抗原血症的检测结果与全血、白细胞或血浆中的 CMV DNA 分子扩增定量检测结果具有良好的相关性[29,59-63]。

在抗原血症的检测中，白细胞(主要是多形核白细胞)是从新鲜采集的全血通过右旋糖酐沉降来富集。已报道从全血中直接裂解红细胞随后分离白细胞的方法[64]，并且已经在许多实验室常规开展这项试验。这种改进缩短了总的检测时间，增加了样本处理量。沉降后，残留的红细胞用氯化铵裂解，粒细胞在血球计数仪或者自动化细胞计数仪上进行计数，将已知数量的细胞(通常为 2×10^5，波动范围为 $5\times10^4\sim1\times10^6$)通过细胞离心法加载到显微镜载玻片上。用甲醛或者多聚甲醛固定细胞，然后用非离子去污剂 Nonidet P-40 透化，并用适合的针对 CMV pp65 的单克隆抗体进行染色。然后用复染剂稀释的异硫氰酸荧光素标记的第二抗体与细胞进行孵育。载玻片通过显微镜放大×200～×400 倍后进行观察。观察到感染细胞的细胞核内出现均匀的黄色到苹果绿荧光，即为阳性结果(图 102-2)。

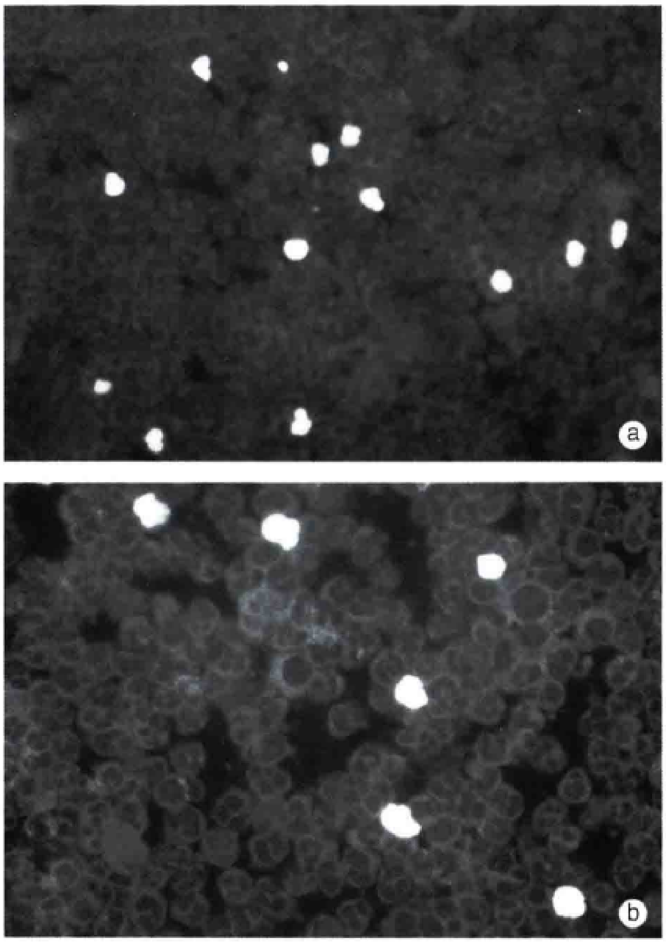


图 102-2 CMV 抗原阳性的多形核白细胞。注意细胞核染色所使用的是针对 pp65 的单克隆抗体染色。放大倍数：×100(a)和×400(b)，见彩插

定量结果通常以“抗原阳性的细胞数量/所检测白细胞总数”来表示。用于预测有症状疾病或促使先发经验治疗的 CMV 抗原血症的绝对值或特定阈值还没有完全建立，以用于对定量结果进行解释，而且它们似乎在不同的患者群体间有所不同。因此，使用多份血液标本，随时监测患者和相对上升和(或)下降的抗原阳性细胞的水平趋势，比仅依靠单次检测结果更加重要。少量抗原阳性细胞的存在通常提示无症状感染，而阳性细胞数增加得越多与临床显性疾病的关系越大。但在严重免疫抑制的患者(如异基因骨髓造血干细胞移植后)中，即使非常少量的抗原阳性细胞也可能有重要意义。对于移植受者，监测频率和程度依据不同的医疗机构和移植群体的不同而异，而且也要依据 CMV 感染和疾病管理的医学方法而定[10,49-50]。

抗原血症检测的主要优点是：①比用于检测血液 CMV 的传统试管或壳瓶培养方法更敏感；

②可在2～4 h内完成，当天提供结果；③检测过程可以很容易地进行改良以对病毒载量进行定量测定。这种检测的缺点是：①费力费时，特别是对大量样本操作时；②血液必须及时处理以得到准确结果；③试验应该由免疫细胞化学技术经验丰富的人员进行操作，因为结果解读可能带有主观性。在分离和计数细胞，调节细胞浓度为10^6/ml后制备载玻片并染色，然后阅读染色的载玻片，这些操作都需要大量的时间、精力和专业知识。此外，关于操作抗原血症检测的确切步骤，不同实验室间存在差异[65-67]，然而该检测不太可能进行深入标准化，因为大部分实验室现在使用定量分子检测来监测CMV感染。用于抗原血症检测的包含单克隆抗体和其他试剂有商品化试剂盒（表102-2）。FDA已经批准了这些检测中的几种，经比较研究已经证实其性能相当。由于通量低，抗原血症检测最适合于处理少量样本的实验室。

表 102-2 商品化用于CMV抗原血症的检测

制造商	产品名称[a]	推荐的血液采集与处理方式			细胞分离技术	每块玻片上的细胞数量	使用的单克隆抗体	总测试时间(h)	参考文献
		血量(ml)	可用的抗凝剂	储存条件					
Bio-Rad (IQ Products)	CMV Brite	5～10	肝素或EDTA	20～25℃ 6～8 h	葡聚糖沉淀法	1.5×10^5	C10/C11	4～5	166-167
	CMV Brite Turbo	3～5	EDTA	20～25℃ 6～8 h	氯化铵直接红细胞溶解法	2.0×10^5	C10/C11	2	167-169
bioMérieux, Inc.	Argene CINAkit HCMV ppUL83 rapid antigenemia	7	肝素或EDTA	2～8℃ 最多24 h	葡聚糖沉淀法或氯化铵直接红细胞溶解法	2.0×10^5	IC3+AYM-1	4～5或2	167,170
Millipore Sigma	Light Diagnostics CMV pp65 antigenemia	5～10	肝素或EDTA	20～25℃ 最多24 h	葡聚糖沉淀法或氯化铵直接红细胞溶解法	2.0×10^5	专利产品	4～5或2	171

注：[a]CMV Brite、CMV Brite Turbo和CINAkit经FDA批准仅用于定性检测；Light Diagnostics kit未经FDA批准；所有试剂都经CE认证

(三)核酸检测

多年以来，分子扩增试验已经逐步取代抗原血症检测和其他非分子直接检测试验，用于CMV感染的诊断和监测。在检测CMV DNA和mRNAs方面，PCR是目前最受青睐和最广泛使用的分子生物学方法，而且用于活动性CMV感染诊断的PCR的敏感性和特异性已经进行评估[68-72]。采用不同的配对引物进行扩增，引物来源于不同的基因区域，相应的基因分别编码即刻早期抗原(UL122-123 基因座)、主要即刻早期抗原(UL122-123基因座)、DNA聚合酶(UL54)、糖蛋白B(UL55)和H(UL75)、pp65(UL83)、pp67(UL65)、US17、HXFL4、EcoRI D片段、Hind Ⅲ X片段、pp150被膜蛋白(UL32)、主要衣壳蛋白(UL86)，以及糖蛋白B和主要即刻早期抗原基因之间的连接物。

根据已发表的文献，CMV PCR最常用的靶位包括糖蛋白B、即刻早期抗原、主要即刻早期抗原(immediate early antigen)、*US17*基因，然后是pp65和聚合酶基因。并不是所有的引物在CMV DNA扩增中都有同样的敏感性，有几项研究提示可以通过扩增即刻早期和晚期*CMV*基因的基因区域或者使用针对单个基因片段的巢式引物来增加检测敏感性。应用2种基因片段可以进行各种临床分离株的检测，说明毒株的变异并不是CMV PCR诊断的限制因素。PCR技术已经成功用于检测来自于移植受者、AIDS患者和先天性感染的婴儿的各种不同临床标本的CMV DNA，其也被用于免疫功能不全患者的持续性监测和抗病毒药物治疗的效果评价。

对于PCR用于CMV诊断的关注焦点在于该试验能否区分活动性疾病与无症状感染或潜伏感染。CMV DNA血症被认为是CMV疾病最好的

预测指标，通过 PCR 方法已经成功地在全血、纯化的外周血白细胞、血浆和血清中检测到 CMV DNA。然而，PCR 方法非常灵敏，这些标本的 CMV DNA 定性检测对免疫功能不全患者有症状性疾病预测和抗病毒治疗效果监测方面的作用是有限的。未发病情况下可通过 PCR 在血液中检测到 CMV DNA，并且在有症状患者抗病毒治疗成功后数周甚至数个月内仍可以检测到 CMV DNA[53,73-74]。然而，在一些临床实际工作中定性 PCR 检测看来是有用的，这些包括应用唾液、尿、组织、羊水或者胎儿血液诊断先天性 CMV 感染，以及应用 CMV 视网膜炎患者的房水或玻璃体。同样，血中定性 PCR 的阴性结果对于排除全身性 CMV 疾病也具有高的阴性预测价值，并且多年来定性 PCR 一直被用于血液标本的初始筛查，只有当样本结果阳性后才进行 CMV DNA 定量检测。然而，最近商业化高敏定量分子检测很可能消除对血液样品 CMV DNA 的定性检测的需要。

定性 PCR 也可以用于怀疑有局部的或者界限分明的组织侵袭性疾病的免疫功能不全患者的新鲜、未固定的组织标本检测。然而，应该仔细考虑使用高敏分子生物学方法检测到的 CMV 是否真正代表器官的感染，还是浸润组织的细胞外液所含病毒造成的污染。尽管阴性 PCR 结果可能提示不存在 CMV 组织侵袭性感染，阳性结果可能不一定有意义，阳性结果应该结合临床和组织病理学发现，及血液中 CMV 病毒血症、DNA 血症或抗原血症的检出来考虑。在这一点上，原位杂交或免疫组织化学染色对于组织中的病毒定位有帮助。最近，福尔马林固定、石蜡包埋组织的 CMV PCR 作为免疫组化的一项辅助手段，有助于组织侵袭性疾病的诊断[75-76]，并且与新鲜、未固定组织的 CMV PCR 检测相比，它能提供更特异的诊断。

与抗原血症的检测相似，测定血液中 CMV DNA 水平对于免疫功能不全宿主 CMV 疾病的预测和诊断是必要的[10,49-50]。因此，包括靶点和信号扩增技术在内的许多定量和半定量的分子生物学方法近年来已经发展起来。多数实验室现在使用实时定量 PCR[77-83]，由于采用了各种不同的化学技术和检测平台，可以检测到核酸扩增产物的积累，技术进步也提供了所需数量级的动态范围内的快速、准确定量。同样，CMV 的检测也可整合入其他疱疹病毒的多重测试中，用于器官移植后的同时监测[84-85]。有研究将每一个 PCR 检测与抗原血症检测和分离培养的性能进行比较，同时也将这些 PCR 彼此之间的性能进行比较[59,61-62,86-91]。总体来讲，这些分子生物学方法提供的定量结果可媲美抗原血症提供的结果，它们也都比病毒分离培养法敏感，可以在临床症状出现前检测到 CMV。已经证实有活动性 CMV 疾病的移植受者和 AIDS 患者具有较高 CMV DNA 水平，CMV DNA 拷贝数的快速升高与症状的出现和药物治疗失败有关[60,92-94]。Rasmussen 等[95]也已证实外周血白细胞 CMV DNA 的定量可用于鉴别具有 CMV 视网膜炎患病风险的 HIV 感染患者。也确定了与没有 CMV 疾病的免疫功能不全患者相比，有 CMV 疾病的免疫功能不全患者在全血、血浆或白细胞部分中有更高的 CMV DNA 水平，但全血或白细胞中的 CMV DNA 水平高于血浆的水平[60,96]。因此，用于监测 CMV 感染时血浆 CMV 定量的敏感性可能不足，尽管阳性结果可能与疾病活动的相关性更好。

虽然 PCR 核酸检测与抗原血症检测的结果总体一致，但是定量的数值之间关系并不精确，结果出现差异应该不意外，因为不同方法检测的是 CMV 复制和感染的不同生物学特征。PCR 高度敏感，可能早于抗原血症方法检测到 CMV，而且可能在抗原血症检测阴性后依然持续阳性。相反的是，在某些抗原检测存在较低数量阳性细胞的患者的 PCR 结果为阴性[62]。所以，取决于所用测试和参数，这些检测之间的敏感性可能有高有低，其对 CMV 疾病的阳性预测价值可能也有高有低。与抗原血症检测一样，用于预测有症状疾病和启动先发治疗时 CMV DNA 的绝对水平或者阈值并未完全阐明，并可能因所选的标本类型、测试平台，以及不同的实验室和患者人群而不同。目前更重要的是在一段时间内连续采集血液标本并使用相同的检测方法和相同标本类型来监测 DNA 水平的相对改变。必要时，应该根据所用的检测方法、标本及所监测患者的类型预先确定特定的临界水平(cutoff levels)。由于 PCR 的高度敏感性和依据所选择的临界水平，有症状 CMV 疾病的阳性预测值可能会有所变化，同时可能会影响临床决策和抗病毒治疗的启动和持续时间。

定量 PCR 方法已用于评估 CMV 感染患者尿、唾液、羊水、干血斑和脑脊液中的 CMV DNA

水平[37-38,41-42,97-98]，但需要更多的研究去评价这些标本定量CMV DNA的临床相关性。

研究表明，先天性CMV感染的预后可能直接与感染新生儿的尿和(或)唾液中CMV含量相关，检测孕妇血液或尿中CMV DNA可预测传染给胎儿的可能性，AIDS患者脑脊液中CMV DNA定量可以帮助确定中枢神经系统疾病是否更倾向于是CMV所导致，而不是HIV的直接作用或者其他条件病原菌的作用，检测支气管肺泡灌洗液标本中CMV病毒载量对免疫功能不全患者可能是一种合适的且低侵入性的诊断CMV肺炎的途径[43-45]。

总之，用于CMV DNA定量检测的实时PCR敏感、特异并且重复性好，明显缩短了报告结果的时间，有利于患者的治疗和管理。该检测方法拥有显著优势，与传统的方法相比其技术要求及成本费用较低，并且目前已有用于核酸提取、扩增和检测的高质量试剂及自动化仪器，从而大大提高标准化的可能性和提高结果的准确性。该检测所需的标本量更少，这样可轻松进行中性粒细胞缺乏患者的检测。再者，DNA在长期运输及储存中相对稳定，可以保证大量标本的有效处理。而且，由于实时PCR平台是封闭系统，这样大大减少了扩增产物污染的总体风险。

目前，各种商品化的实时定性和定量PCR检测以特定分析试剂或包装好的完整试剂盒的形式上市(表102-3)。然而，许多CMV实时PCR检测是由实验室终端用户研发出来的，在许多参数都有所不同，这些参数包括：①所使用的标本类型和体积；②标本的收集、转运、处理和储存；③选择的核酸靶位；④选择和设计合适的寡核苷酸引物及探针；⑤优化样本提取及PCR扩增条件；⑥所使用的质控及校准标准；⑦所使用的检测和(或)定量扩增产物的方法；⑧检测和定量的上限和下限；⑨准确度和精密度；⑩不同实验室和方法间检测的定量单位和病毒载量的报告方法。由于发现在不同实验室间CMV定量存在显著差异，许多方法需要额外的验证，而且需要可追溯的和可互换的国际参考物包括标准品和质控品以便于室间结果的比较[99-102]。为此目的，第一代国际CMV标准已由世界卫生组织(World Health Organization，WHO)在2010年研发出来，可从英国国家生物标准和控制研究所(NIBSC)获得，编码为NIBSC 09/162。标准是来源于CMV Merlin株的完整病毒制品，并且该材料最初是由一项涉及32个实验室的国际合作研究进行一系列的CMV分子扩增技术的评价[103]。从这一标准中校准的第二代校准物质可从商业厂家处购买，第二代参考物(SRM 2366a)可从美国国家标准和技术研究院获取[104]。这一参考物由携带CMV Towne株完整病毒基因组的细菌人工染色体组成。使用这些参考标准物和推荐以“国际单位/ml”的病毒载量报告方式，改善了使用不同定量分子检测方法的不同实验室之间的一致性[105-108]，并且应该有助于建立明确的检测程序和临界值，用于预测临床疾病和改善CMV感染患者的管理与预后[109-112]。

已经研发出多个运用这一国际标准的商品化定量检测，而且都已通过FDA认证，包括Abbott RealTime CMV试验、Qiagen artus CMV RGQ MDx试剂盒、Roche cobas AmpliPrep/cobas TaqMan CMV试验及用于cobas 4800和6800/8800自动化系统的Roche cobas CMV试验(表102-3)。这些试验在自动化平台上完成，结果用国际单位/ml表示。在对这些系统评估期间，不同实验室之间的检测已经显示出高度一致性水平。虽然国际标准的发展和更多可用的商品化检测确实有助于CMV病毒载量检测和报告的一致性，实验室内和室间的差异还没有被完全消除，这被认为是由试验设计和一系列可追溯和可互换的通用标准之外的分析因素所致[102,105,113-117]。

最近，数字PCR(digital PCR)作为一种定量方法已经发展起来，许多研究显示了这一试验用于血浆样本中CMV准确定量的临床应用[118-120]。数字PCR与实时定量PCR相似，具有相同的反应成分和扩增条件，但在扩增靶点的检测上存在不同。该试验将样本反应混合物分配到数千个更小的皮升级或纳升级的单个PCR反应体系中，并基于样本分配遵循泊松分布的假设，导致单个反应中只有一个靶分子或完全没有靶分子。包含靶分子的反应混合物将被扩增，在PCR期间出现阳性荧光，而没有靶分子的反应将会是阴性。PCR完成后，计数阴性和阳性反应，结果将基于泊松统计学分析计算样品中靶分子的拷贝数。数字PCR的主要优点是在不需要参考标准或校准曲线的情况下提供CMV DNA绝对定量以方便病毒载量的测定。该试验可提供比现有定量方法更高的实验

表 102-3 定性和定量检测 CMV 的商品化分子检测[a]

制造商	产品	标本(ml)	靶标因	测定	监管状况	参考文献
Abbott Molecular	Abbott RealTime CMV	美国：血浆；美国之外：全血或血浆	UL34 和 UL80.5	定量；以人 CMV 第一代 WHO 国际标准校准；线性范围：在美国，血浆为 50 U/ml～156×10^6 U/ml；在美国以外，血浆为 31.2 U/ml～156×10^6 U/ml，全血为 62.4 U/ml～156×10^6 U/ml	FDA 批准；CE 认证	172-175
Altona Diagnostics	RealStar CMV PCR 试剂盒 1.0 和 1.2	血浆	专利产品	定性和定量；以人 CMV 第一代 WHO 国际标准校准；经不同的提取法和实时定量 PCR 仪验证；线性范围随使用的仪器而变化	仅 CE 认证	176
bioMérieux, Inc.	Argene CMV R-gene	全血、血浆、血清、尿、脑脊液、羊水、肺泡灌洗液、组织	UL83 pp65	定性和定量；经不同的提取法和实时定量 PCR 仪验证；线性范围随使用的仪器和标本类型而变化	仅 CE 认证	177
	Argene CMV HHV6,7,8 R-gene	全血、血浆、血清、尿、脑脊液、羊水、肺泡灌洗液、组织	CMV UL83 pp65；HHV-6 U57；HHV-7 U42；HHV-8 ORF26	定性和定量；经不同的提取法和实时定量 PCR 仪验证；线性范围随使用的仪器和标本类型而变化	仅 CE 认证	30,178
ELITech-Group	CMV ELITe MGB 试剂盒	全血、血浆、尿、唾液、脑脊液、羊水	UL123 MIEA	定性和定量；经不同的提取法和实时定量 PCR 仪验证；线性范围随使用的仪器和标本类型而变化	仅 CE 认证	179,180
	Alert Q-CMV Real Time Complete 试剂盒	全血、血浆、羊水、白细胞和粒细胞悬液	UL123 MIEA	定性和定量；经不同的提取法和实时定量 PCR 仪验证；线性范围随使用的仪器和标本类型而变化	仅 CE 认证	181
Focus Diagnostics	Simplexa CMV	全血或血浆	UL83 pp65	定量；以人 CMV 第一代 WHO 国际标准校准；线性范围 713 U/ml～396×10^{6}U/ml	仅 CE 认证	179
	CMV primers	各种标本	UL83 pp65	定性和定量；分析和性能特征必须由终端用户建立	实验室自建项目的 ASR	
Luminex Corp.	Multicode CMV primers	各种标本	UL54 聚合酶	定性和定量；分析和性能特征必须由终端用户建立	实验室自建项目的 ASR	179
Qiagen, Inc.	artus CMV RGQ MDx 试剂盒	血浆	UL123 MIEA	定量；以人 CMV 第一代 WHO 国际标准校准；线性范围 159 U/ml～79.4×10^6 U/ml	FDA 批准；CE 认证	182,183
	artus CMV RG, TM, LC 和 QS-RGQ PCR 试剂盒	血浆	UL123 MIEA	定量；经不同的提取法和实时定量 PCR 仪验证；线性范围随使用的仪器而变化	仅 CE 认证	178,184
Roche Diagnostics	cobas AmpliPrep/cobas TaqMan CMV 试验	血浆	UL54 聚合酶	定量；以人 CMV 第一代 WHO 国际标准校准；线性范围 137 U/ml～9.1×10^6 U/ml	FDA 批准；CE 认证	172,180,185-190
	用于 cobas 4800 和 6800/8800 系统的 cobas CMV	血浆	UL54 聚合酶(更小的扩增子)	定量；以人 CMV 第一代 WHO 国际标准校准；线性范围 34.5 U/ml～10×10^6 U/ml	FDA 批准；CE 认证	

[a]MIEA. 主要即刻早期抗原；ASR. 分析物特异性试剂

室内和室间精密度[121]，且受低扩增效率和临床样本中可能存在的干扰物质的影响更少[119,122]。然而，在定量检测 CMV 时数字 PCR 似乎并不如实时定量 PCR 敏感，而且仍需进一步优化[119]。

几个数字 PCR 平台已经市售，主要在单个反应的分配方式上存在不同，使用水油乳化液滴或基于微芯片的阵列。它们包括 RainDrop Plus 数字 PCR 系统（RainDance Technologies）、QX200 Droplet 数字 PCR 系统（Bio-Rad）、BioMark HD 系统（Fluidigm Corporation）和 QuantStudio 3D 数字 PCR 系统（Life Technologies）。至今，这些商品化系统都没有被 FDA 批准。

目前，支持数字 PCR 对 CMV 病毒载量检测的数据有限，需要研究来对比数字 PCR 与现有经 FDA 批准的实时定量 PCR 系统对 CMV 病毒载量的检测，以便更好地了解这种新技术在临床实验室的适用性和使用情况。

最终，这些检测方法的临床应用取决于它们的准确度、可重复性、精确度、易用性、成本、可用性和预测值。然而，现在分子生物学方法被认为是对于已运用的分析工具的非常重要的补充，用于提供确定的 CMV 疾病的快速诊断，鉴别有患病风险的患者，评价疾病的进程和复发风险，指导启动先发治疗，监测治疗效果，预测病毒耐药性及治疗失败，以及确定何时需要进行抗病毒药物敏感性试验以识别出现的 CMV 耐药性。

七、病毒分离程序

(一)细胞培养

人成纤维细胞可最好地支持 CMV 生长，因此该细胞被用于诊断的目的。用于 CMV 培养的可用成纤维细胞包括那些来自人胚胎组织或阴茎包皮，以及连续传代的二倍体胚胎肺细胞株例如 WI-38，MRC-5 或 IMR-90。应使用低传代数的二倍体成纤维细胞，因为随着传代代数的增加，可能会使细胞对 CMV 不易感。多种上述成纤维细胞系已有商品化供应。用于临床标本中 CMV 检测的细胞培养系统包括传统的试管培养法和旋转扩增壳瓶培养法。目前，尽管某些实验室仍然使用细胞培养法，但由于整体性能好、简便易行、更新且更高效的基于非培养检测方法的应用，减少了培养法在 CMV 检测的临床应用。

(二)传统的试管培养法

将 0.2 ml 待检测标本加入已融合的成纤维细胞试管中，细胞用含 2%胎牛血清的 Eagle minimal essential medium(EMEM)培养基进行培养。或者用另一种方法，弃去试管中的培养基，将接种物(标本)静置吸附 1 h，或者在 30～33℃ 通过 700×*g* 离心 45 min 吸附，然后加入新鲜的培养基。接种后，这些试管可以在 37℃ 转动或者静置培养。24 h 后，接种了尿或白细胞标本的细胞要更换培养基(译者注：对于其他类型标本，24 h 后无须换液)。此后，对于其他类型标本，1 周 1 次更换培养基，或者当培养基 pH 改变或者出现细胞毒性时要换液。当细胞毒性作用出现需要对培养物传代时，必须将细胞传代而不是培养液，因为 CMV 多数情况下是与细胞结合的。具体做法是向细胞单层(接种后的)加入 0.25%胰蛋白酶-0.1%EDTA 溶液，在 37℃ 孵育大约 1 min。当细胞解离后加入含有 2%胎牛血清的 EMEM 培养基，再把细胞转移接种到新的试管中。要检查试管出现的细胞病变效应(cytopathic effect，CPE)，对于大多数标本，至少需要观察 4 周(白细胞标本观察 6 周)。未接种标本的细胞培养作为对照，操作方法与接种临床标本的细胞培养一致。

CMV 分离毒株的鉴定一般是单靠特征性 CPE 和宿主细胞的范围。接种后 CPE 出现的时间和程度取决于标本中所含病毒量。在培养细胞中接种来自先天性感染新生儿的尿后，如果尿中的病毒滴度特别高时，CPE 可能在 24 h 内出现并快速波及大多数单层细胞。更常见的是，在第 1 周出现由胀大的、圆形的折光增强细胞组成的灶状 CPE，CPE 向周围细胞的蔓延进展缓慢(图 102-3)。用来自老年人的尿或呼吸道标本接种的培养细胞，CPE 通常在 2 周内出现。白细胞接种的培养可能需要在 3～6 周后才会变成阳性。在接种了临床标本的试管中，通常 CPE 出现缓慢，其部分原因是有限的病毒释放到细胞外液。经过连续传代的 CMV 毒株，包括实验室适应毒株，更多细胞外病毒被释放，CPE 进展较快。其他病毒，例如，腺病毒和水痘-带状疱疹病毒偶然也可产生与 CMV 无法区分的 CPE，所以疑似 CMV 分离株最好通过使用各种商业渠道来源的单克隆或多克隆抗体的免疫荧光试验(immunofluorescence assay,

IFA)进行确认。感染细胞内出现典型的细胞核荧光提示 CMV 的存在。PCR 或其他分子扩增方法也可用于疑似毒株的确认。

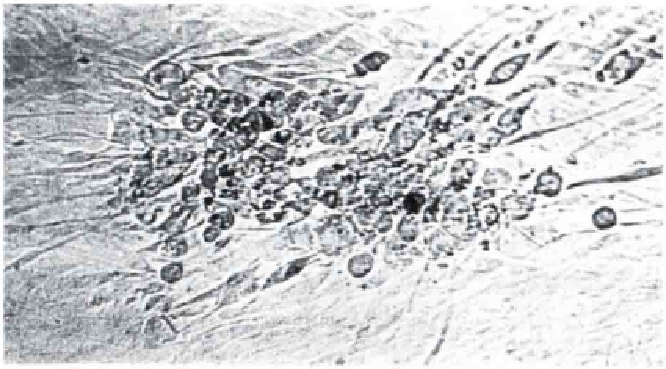


图 102-3　在人皮肤成纤维细胞接种 CMV 分离株 10 天后产生的 CPE。未经染色标本，×100(Sergio Stagno 供图)

对于新鲜分离株的储存，使用胰蛋白酶-EDTA 将出现 CPE 的单层细胞进行消化处理，将获得的细胞悬浮在含有 10%胎牛血清和 10%二甲基亚砜的 EMEM 培养基中，然后在－70℃冻存。在液氮中储存能更好地长期维持其感染性。

(三)旋转扩增壳瓶培养法

旋转扩增壳瓶培养法已经广泛用于临床标本 CMV 检测的快速培养方法，并已在大多数实验室很大程度上取代了较慢的传统试管培养。该技术是基于(接种标本后)低速离心后细胞培养物中的病毒扩增，然后在 CPE 出现前检测 CMV 复制早期产生的病毒抗原。即使标本中存在的病毒滴度较低也可被轻松扩增，可在 24 h 内快速检出。用于 CMV 早期抗原检测的单克隆抗体可在市面上购得。

在 3.7 ml(1-dram)壳瓶内，MRC-5 成纤维细胞在 12 mm 直径的圆形盖玻片上生长融合后，将 0.2 ml 临床标本接种在单层细胞中。接种了 MRC-5 细胞的壳瓶可以商品化购得或在实验室中制备。制备后的单层细胞应当在 1 周内接种，因为陈旧的单层细胞对 CMV 敏感性低，且毒性增加。2 个小瓶应用于尿、组织和支气管肺泡灌洗液样本的接种，3 个小瓶应用于血液标本的接种。此外，在接种前使用超声波破碎纯化的白细胞可以提高从血液中检测 CMV 的敏感性。增加采集血液的频率和采集量，也可提高壳瓶培养检测对此类标本的检出率。接种标本后，将小瓶在 25℃ 700×g 条件下离心 40 min，然后加入 2 ml 含 2%胎牛血清和抗生素的 EMEM 培养基。将培养物在 37℃孵育 16～24 h，用丙酮固定并染色。也可以采用更长孵育时间，但是细胞培养时间的选择，应当根据操作者的经验、所用试剂和染色技术，以及单层细胞是外购还是实验室自制来确定。未经感染的和 CMV 感染的单层细胞分别作为阴性和阳性对照。水貂肺(ML)细胞是一种非人类的连续传代细胞系，通过壳瓶培养方法检测临床标本 CMV 的效果与 MRC-5 成纤维细胞相当。使用 ML 细胞的显著优点是，该细胞系可以在实验室中长期增殖和传代而不降低对 CMV 的易感性。而且可明显观察到 ML 细胞产生的毒性很低和 CMV 阳性细胞核的数量增加。盖玻片可在×200～×250 倍放大的显微镜视野中进行快速查看，在×400～×630 倍确认特异性染色。相对于红色的细胞质背景，阳性细胞包含细胞核内黄色到苹果绿色荧光。即刻早期抗原的染色表现以均匀的哑光黄色到绿色荧光，并且带有亮黄色到绿色斑点(图 102-4a)。病毒包涵体(猫头鹰眼)可以在细胞核内查见(图 102-4b)。

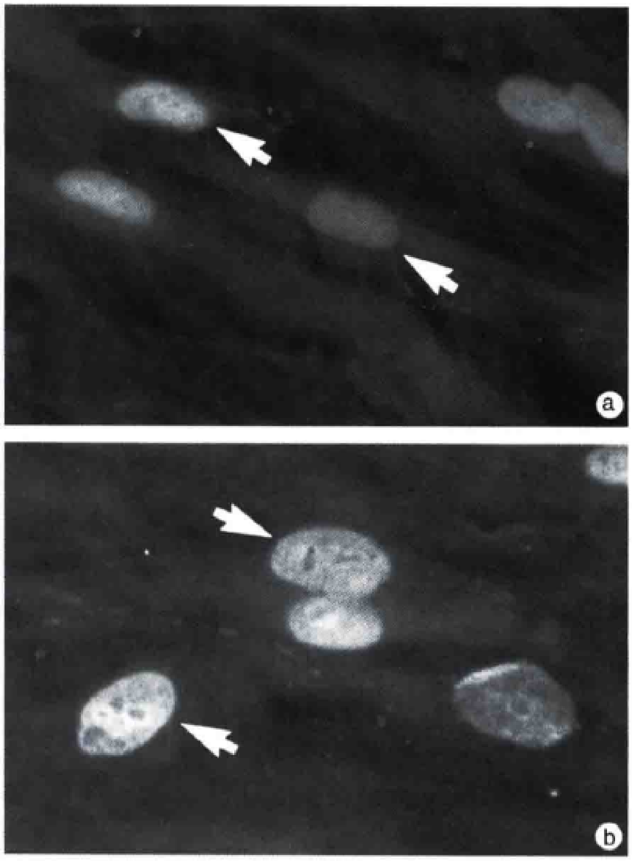


图 102-4　经壳瓶培养和 IFA 染色，显示被感染 MRC-5 细胞胞核中 CMV 早期抗原(箭头)

注：a. 即刻早期抗原染色显示为均匀的哑光黄色到绿色荧光并带有亮黄色到绿色斑点；b. 病毒包涵体(猫头鹰眼)可以在细胞核查见。放大倍数，×400，见彩插

旋转扩增壳瓶培养法具有快速、灵敏和特异性高的重要特点，但要达到最佳操作需要熟练的技术人员，以及密切关注标本、单层细胞和试剂的质量。

八、血清学试验

对于CMV的IgM或IgG抗体的检测，已有许多高敏感性和特异性的方法可用[123]。在决定采用哪种试验前，应该考虑这些因素，如检测样本量、患者群体、费用、试验周转时间、设备需求和操作难易程度。具体方法的选择取决于各个实验室的需求。对于检测量小的实验室，IFA可能成本效益和实用性更好，而酶免疫分析法(enzyme immunoassays，EIAs)可能更适合于样本量更大的实验室。总体而言，检测CMV特异性IgM或确定IgG抗体反应由阴性到阳性的血清学转化，在某些临床情况下可用于原发性CMV感染的诊断，对血液和器官供者和受者的筛查在阻断CMV从潜伏感染者传播到严重CMV疾病高风险感染患者中具有重要的作用。

(一)酶免疫分析法

多年来，固相EIAs已经在很大程度上取代其他传统检测CMV抗体的方法。检测形式多样，固相可能包括微孔板、聚苯乙烯珠、微粒或顺磁颗粒，可使用荧光染料、化学发光和电化学发光分子产生的准确信号来检测抗体。EIAs的主要优点是快速、灵敏和特异。此外，每天可用相对低的成本处理大量标本。有许多商品化来源的CMV IgG和IgM检测试剂盒可提供(表102-4)。这些试剂盒操作简便，且厂家已经提供详细操作说明。

表102-4 可供选择的CMV IgM、IgG和IgG亲和力抗体检测商业化免疫检测系统

制造商	系统	CMV检测的可用性	
		美国	美国以外
Abbott Diagnostics	Architect i1000SR，i2000SR，i4000SR	无	IgM、IgG和IgG亲和力
Beckman Coulter，Inc.	Access/Access2	无	IgM和IgG
	Unicel Dxl 600，Dxl 800，DxC 600i，DxC 660i，DxC 680i，DxC 860i，DxC 880i	无	IgM和IgG
bioMérieux，Inc.	VIDAS/Mini-VIDAS	IgM和IgG	IgM、IgG和IgG亲和力
Bio-Rad Laboratories	BioPlex2200	IgM和IgG	IgM和IgG
	EVOLIS Premium/EVOLIS Twin Plus	IgM和IgG	IgM和IgG
DiaSorin，Inc.	ETI-MAX3000	IgM捕获和IgG	无
	LIAISON	IgM和IgG	IgM、IgG和IgG亲和力
Diesse Diagnostica	试剂盒	IgM捕获、IgG和IgG亲和力	IgM捕获、IgG和IgG亲和力
Euroimmun	试剂盒	IgM、IgG和IgG亲和力	IgM、IgG和IgG亲和力
Mikrogen Diagnostik	试剂盒	IgM、IgG和IgG亲和力	IgM、IgG和IgG亲和力
Ortho Clinical Diagnostics	VITROS ECi	无	IgM和IgG
	VITROS 3600/5600	无	IgM和IgG
Radim Diagnostics	试剂盒	IgM捕获、IgG和IgG亲和力	IgM捕获、IgG和IgG亲和力
Roche Diagnostics	Cobas 8000(e602 module)	IgM和IgG；IgG亲和力在研发中	IgM、IgG和IgG亲和力
	Cobas 6000(e601 module)	IgM和IgG；IgG亲和力在研发中	IgM、IgG和IgG亲和力
	Cobas 4000(e411 module)	IgM和IgG；IgG亲和力在研发中	IgM、IgG和IgG亲和力
Siemens Healthcare Diagnostics	ADVIA Centaur CP，XP，XPT	IgM和IgG在研发中	IgM和IgG在研发中
	IMMULITE 2000/2000 XPi	IgM和IgG	IgM和IgG

（续　表）

制造商	系统	CMV 检测的可用性	
		美国	美国以外
	IMMULITE1000	IgM 和 IgG	IgM 和 IgG
Technogenetics	试剂盒	无	IgM、IgG 和 IgG 亲和力
Trinity Biotech	使用半自动洗板机和阅读器，Trinity Biotech DSX/DS2 自动开放系统，或其他可以编程以执行 Trinity Biotech 免疫检测所有分析步骤的开放平台（如 Awareness Technology Chem Well 2910，Bio-Rad PhD/PhD Ix 和 EVOLIS Premium/EVOLIS Twin Plus，Diamedix MAGO 4S/MAGO Plus，Dynex Technologies Agility，GRIFLOS Triturus，Inova Diagnostics Quanta-Lyser 240/160/2 和 DSX/DS2）	IgM 捕获和 IgG	IgM 捕获和 IgG
Vidia	试剂盒	IgM 捕获、IgG 和 IgG 亲和力	IgM 捕获、IgG 和 IgG 亲和力
Virion/Serion	试剂盒	IgM 和 IgG	IgM 和 IgG
Wampole(Alere)	使用半自动洗板机和阅读器，Alere DSX/DS2 自动开放系统，或其他可以编程执行 Alere 免疫检测所有分析步骤的开放平台（如 Awareness Technology Chem Well 2910，Bio-Rad PhD/PhD 1x 和 EVOLIS Premium/EVOLIS Twin Plus，Diamedix MAGO 4S 和 MAGO Plus，Dynex Technologies Agility，GRIFOLS Triturus，Inova Diagnostics Quanta-Lyser 240/160/2 和 DSX/DS2）	IgM 和 IgG	IgM 和 IgG
Zeus Scientific	AttheNA Multi-Lyte	IgG	IgG

所有检测所需的耗材都包括在内，所用试剂长时间稳定。有些公司也同时提供分光光度计和自动洗板机，否则用户就需要额外费用单独购买这些设备。机器人技术的发展导致商品化全自动化和半自动化 EIA 仪器的出现，包括样本分配器、稀释器、洗板机和分光光度计，并带有编程和产生电子和手写报告的完整计算机系统。一些自动化仪器也具备"随到随做"的能力，这个重要优势在于允许对实验室接受的多个样本进行持续加载和管理，并允许每个样本运用个性化测试配置方案。随到随做系统通常也包含试剂和废物监测、自动校准和维护程序。

最近，已经研发了采用包膜糖蛋白 B 和 H 来区分 CMV 株特异性抗体反应的 EIA 技术[124]。该测定可以用于鉴别来自不同患者人群毒株的多样性，并可能帮助人们更好地理解多种 CMV 毒株共感染的可能影响，以及毒株特异性抗体在对 CMV 保护性免疫反应中发挥的作用。

(二)免疫荧光试验

间接和抗补体 IFAs 是检测 CMV 抗体的常用方法。在间接 IFA，将测试血清的稀释液与固定在显微镜载玻片上的病毒感染细胞一起孵育。使用标记了异硫氰酸荧光素的抗人免疫球蛋白抗体和荧光显微镜进行特异性抗体-抗原复合物的检测。抗补体免疫荧光法与间接 IFA 相似。然而它的不同在于，测试血清首先需要加热灭活，以去除内源性补体活性，然后与载玻片上的病毒感染细胞一起孵育。加入外源性补体，使其与已形成的特异性抗原-抗体复合物结合。然后加入荧光素标记的抗补体抗体，它与补体的 C3 部分结合，然后使用荧光显微镜读取载玻片。抗补体 IFA 放大的荧光信号，超过用间接 IFA 所能观察到的水平，因此能够对少量抗体或低亲和力

抗体的检测。IFAs 是较为经济适用的检测方法，对于 CMV 抗体的定性和定量检测具有快速和简单的优势。商品化试剂盒都是现成的，或抗原包被的载玻片和标记的第二抗体可以单独购买。IFA 系统的主要缺点是需要观察载玻片的荧光显微镜和暗室，并且读片和试验结果解释需要经过大量的培训。

(三)CMV IgM 抗体测定

商品化试剂和完整的 EIA 和 IFA 诊断试剂盒可用于检测 CMV IgM 抗体(表 102-4)，是诊断新生儿 CMV 感染最有用的方法。检测步骤与 IgG 抗体检测基本一致，除外那些用合适标志物标记的抗人 IgM 抗体，后者用于检测结合在固相的病毒抗原上的 CMV 特异性 IgM。在测定 CMV IgM 抗体时，公认的难点在于存在假阳性和假阴性反应。当血清中存在含有特异性 CMV IgG 并含有异常高水平类风湿因子时，可以出现假阳性反应。类风湿因子是一种免疫球蛋白，通常是 IgM 类，可与 IgG 反应。它产生于一些风湿性、血管炎性和病毒性疾病，包括 CMV 感染。IgM 型类风湿因子可与 IgG 形成复合物，这些 IgG 可能含有 CMV 特异性 IgG。CMV IgG 与 CMV 抗原结合，并携带有非病毒的 IgM；在这种情况下，设计用于检测 IgM 的试验将会产生假阳性结果。如果高水平的特异性 IgG 抗体竞争性地阻断 IgM 与 CMV 抗原的结合，则会出现假阴性反应。因此，强烈推荐在试实验前分离 IgM 和 IgG 成分，以减少假阳性和假阴性的 IgM 检测结果的发生。

已经研发了用于去除血清中干扰性类风湿因子和 IgG 分子的快速简便方法，主要包括固相选择性 IgM 吸附，以及通过运用超免疫抗人 IgG 抗体、葡萄球菌蛋白 A 或来源于 G 群链球菌的重组蛋白 G 来去除 IgG。现在已经有血清预处理方法，并已整合到商品化 IFA 和 EIA 试剂盒的操作中，这使 IgM 检测更为可靠。最近，反向捕获固相 IgM 试验已经作为一种替代方法用于避免假阳性及假阴性结果。该方法使用包被抗人 IgM 抗体的固相去捕获血清标本中的 IgM，随后通过清洗去除竞争性的 IgG 抗体和免疫复合物。随后，结合的 IgM 抗体暴露于特异的 CMV 抗原，并加入酶结合二抗和底物。作为抗原底物的重组衍生 CMV 蛋白的研发和使用也大大改善了 IgM 检测的性能。

尽管 CMV 特异性 IgM 抗体检测可能有助于确定近期或活动性感染，但结果解释应当谨慎。由于 IgM 不能透过胎盘，因此感染新生儿的单份血清标本出现阳性结果具有诊断意义。但是，也有新生儿 IgM 产生缺乏或延迟的可能性。由于 IgM 抗体可以出现在 CMV 原发和再激活感染中，并且在原发感染后可以持续存在较长时间，因此一般不主张对新生儿期以后的患者进行 CMV 特异性 IgM 抗体检测。这使试验结果的解释变得复杂，尤其对于孕妇及免疫功能不全患者，而且不能预测近期或活动性感染。由于实际上低于 10%CMV IgM 阳性孕妇分娩的婴儿患有先天性 CMV 感染，母体血清中检出 CMV 特异性 IgM 并不表示病毒会传染给胎儿。与新生儿相似，免疫功能不全患者可以出现 IgM 抗体产生的延迟或者不能产生明显的 IgM 抗体反应。最后，EB 病毒引起的传染性单核细胞增多症患者或水痘-带状疱疹病毒所致的水痘患者可能产生异质性 IgM 抗体反应，导致 CMV IgM 假阳性检测结果。

(四)IgG 亲和力试验

考虑到上述 CMV IgM 检测的局限性，已证实 CMV 特异性 IgG 亲和力测定可用于区分原发与非原发感染，特别是怀孕期间怀疑 CMV 感染的妇女[37-38,125]。在原发感染后最初数周到数月内会产生低亲和力的 CMV 特异性 IgG，而既往感染或非原发感染会产生亲和力逐渐升高的 IgG 抗体。

可用的商品化 CMV 特异性 IgG 亲和力检测(表 102-4)，其检测主要是对常规 EIA 流程进行简单修改[125]。检测时，将血清的等分样本与结合到固相的 CMV 特异性抗原进行平行反应，使用尿素(首选)、硫氰酸钾或氯化胍作为其中一等份样本的变性剂优先分离，随后辨别弱结合力的低亲和力抗体-抗原反应与结合力更强的高亲和力抗体-抗原反应。样本中 CMV 特异性 IgG 的亲和力是通过检测两等份样本的光密度值差异来确定，并表示为亲和力指数。

大多数可用的 IgG 亲和力试剂盒为 EIAs 形式被设计为免疫印迹分析(Mikrogen Diagnostik, Neuied, Germany)。一些试剂盒可以在美国购

买，但都没被 FDA 批准用于临床，在美国尚没有可用在自动化平台的 IgG 亲和力检测。

许多研究[37,125-127]已经证实：在怀疑 CMV 感染的孕妇检测到低亲和力 CMV 特异性 IgG 抗体结合 CMV IgM 阳性结果是原发感染和胎儿宫内感染风险增加的可靠证据，而在 CMV IgM 阳性的情况下检测到高亲和力 CMV IgG 则很可能提示再激活或既往感染（表 102-5）。IgG 亲和力的成熟是一个逐步过程，在感染的前 3～4 个月为低亲和力，感染后 5～6 个月为高亲和力，中间有 1～2 个月过渡期可以观察到中等亲和力指数。因此，在孕早期（译者注：怀孕前 3 个月）发现孕妇中高亲和力 CMV IgG 强烈提示怀孕前感染，生出 CMV 感染婴儿的风险低；而在妊娠任何时间检出低亲和力 CMV IgG 可能提示怀孕后感染，可能需要侵入性方法以确定胎儿是否被感染。尽管中等亲和力 CMV IgG 与结果解释有关，但已证实中等亲和力 IgG 与高亲和力结果更接近，并且最可能提示再激活或既往感染。关于 CMV 特异性 IgG 亲和力成熟的动力学，已经表明具有 CMV IgM 阳性结果和低 IgG 亲和力指数的孕妇，当她的 IgG 亲和力随着时间推移出现快速上升，则病毒传染给未出生胎儿的风险更高[128]。

表 102-5　疑似孕期 CMV 感染妇女的 CMV 特异性 IgM、IgG 和 IgG 亲和力检测的结果解释

IgM	IgG	IgG 亲和力	解释
阴性	阴性	不适用	没有感染；具有原发 CMV 感染风险
阳性	阴性	不适用	极早期 CMV 感染；垂直传播给胎儿的风险升高；也处于 CMV IgG 抗体从阴性到阳性的血清学转换阶段
阳性	阳性	低	可能是急性感染；IgM 阳性结果结合低 IgG 亲和力结果被认为是孕妇原发性 CMV 感染和垂直传播给胎儿的风险升高的可靠证据；需要额外的方法检测胎儿的 CMV 感染
阳性	阳性	高或中等	以前的潜伏感染再激活或既往感染；垂直传播给胎儿风险低
阴性	阳性	不适用	通常提示既往感染；如果临床高度怀疑 CMV 感染时需要进行 IgG 亲和力检测

通常，CMV 特异性 IgG 亲和力测试只用于 CMV IgG 阳性且 CMV IgM 抗体阳性样本的检测。然而，研究表明，对于 CMV IgG 阳性但 CMV IgM 阴性的样本检测中，该检测流程可能漏掉 1%～3%的原发感染[125]。

（五）CMV 特异性细胞介导免疫功能的测定

CMV 特异性 $CD4^+$ 和 $CD8^+$ T 细胞反应是控制 CMV 复制和症状性感染发生的关键。多年来，已经建立许多用于评估 CMV 特异性细胞介导免疫反应的试验方法[46-48,129-131]。这些包括酶联免疫吸附试验（enzyme linked immunosorbent assay，ELISA）[132-136]和酶联免疫斑点测定法试验（ELISPOT）[137-141]、多色流式细胞术[142-146]及主要组织相容性复合体（major histocom patibility，MHC）Ⅰ类分子和Ⅱ类分子四聚体的使用[147-149]。这些技术在程序上有所不同，但基本原理在本质上是相同的。ELISA 和 ELISPOT 技术检测 CMV 特异性抗原或多肽刺激全血或 PBMCs 后的 γ-干扰素释放。多色流式细胞术对 CMV 特异性抗原刺激应答后细胞内累积的 γ-干扰素和其他细胞因子（如肿瘤坏死因子 α、白介素 2 和白介素 6）进行染色。最后，CMV 特异性抗原相关 MHCⅠ类分子和Ⅱ类分子四聚体分别用于结合 $CD8^+$ 和 $CD4^+$ T 细胞表面的 T 细胞受体，并定量对指定 CMV 抗原和匹配的 MHC 等位基因特异的 T 细胞[147-149]。如 QuantiFERON-CMV（Qiagen，Hilden，德国）、T-SPOT. CMV ELISPOT（Oxford Immunotec Ltd.，Milton，英国）和 T-Track CMV ELISPOT（Lophius Biosciences，Regensburg，德国）等检测已经商品化和配套为完整试剂盒，并在欧洲获得 CE 认证（表 102-6）。此外，许多制造商还提供单个 CMV 特异性蛋白和多肽（主要是 pp65 和 IE-1 抗原，及单独的试剂和即用型试剂盒，用于开发用户定义的 γ 干扰素释放试验和流式细胞术 T 细胞计数试验。ImmuKnow 试验（Eurofins Viracor-IBT Laboratories，Lee's Summit，MO）是测定受刺激 $CD4^+$ T 细胞的胞内 ATP 浓度，是唯一得到 FDA 批准的试验，可检测整体免疫功能，而不是特异细胞介导的抗 CMV 免疫应答；该检测只能通过 Eurofins Viracor-IBT 实验室获得（表 102-6）。

表 102-6 可供选择的 CMV 特异性免疫监测的免疫试验[a]

试验(制造商)	原理	样本	检测时间(h)	重要特征	参考文献
QuantiFERON-CMV(Qiagen)	使用 22 种 CMV 特异性多肽混合物刺激全血中的 T 细胞；然后用 ELISA 检测释放入血浆的 IFN-γ	3 ml 全血；1 ml/管	19～27	少量血液即可检测；使用特殊采血管；只检测 $CD8^+$ T 细胞应答；局限于特定 HLA Ⅰ类分子；不确定(无法解释)结果的概率高；商品化试剂盒；仅得到 CE 认证	132-136，138，139
T-SPOT. CMV (Oxford Immunotec Ltd)	使用 CMV 特异性 IE-1 和 pp65 蛋白刺激分离的 PBMCs；然后用 ELISPOT 检测抗体捕捉和膜结合 IFN-γ 的释放	根据年龄取 2～12 ml 全血	21～25	在单细胞水平检测；检测 $CD4^+$ 和 $CD8^+$ T 细胞、NK 细胞和 NKT 细胞应答；与 HLA 类别无关；商品化试剂盒；仅得到 CE 认证	
T-TRACK CMV (Lophius Biosciences)	使用 CMV 特异性 IE-1 和 pp65 蛋白刺激分离的 PBMCs；然后用 ELISPOT 检测抗体捕捉和膜结合 IFN-γ 的释放	7.5 ml 全血	20～24	在单细胞水平检测；检测 $CD4^+$ 和 $CD8^+$ T 细胞、NK 细胞和 NKT 细胞应答；与 HLA 类别无关；商品化试剂盒；仅得到 CE 认证	191-193
FastImmune Intracellular Cytokine Detection(BD Biosciences)	使用 CMV 特异性 pp65 多肽混合物刺激全血中的 T 细胞或分离的 PBMCs；然后用流式细胞术检测细胞内 IFN-γ 和其他细胞因子的累积	1～7 ml 全血	8～24	已刺激细胞使用抗 IFN-γ 和其他细胞因子(如 IL-2、IL-6、TNF-α)的单克隆抗体染色；检测 $CD4^+$ 和 $CD8^+$ T 细胞应答；与 HLA 类别无关；有商品化抗体	194-195
iTAg MHC Tetramers (Beckman Coulter)	使用 CMV 特异性多肽结合的 MHC Ⅰ类分子和Ⅱ类分子四聚体计数全血中的 T 细胞(首选)或 PBMCs；然后用流式细胞术分析	0.5～1.0 ml 全血	1～2	少量血液即可检测；方法快速，相对简便；检测 $CD4^+$ 和/或 $CD8^+$ T 细胞应答；有商品化试剂	147-149
ImmuKnow(Eurofins Viracor-IBT Laboratories)	使用植物血凝素刺激 T 细胞；然后捕捉 $CD4^+$ T 细胞并检测裂解细胞中释放的合成 ATP 浓度	2～3 ml 全血	24	概括检测免疫功能程度；非 CMV 特异性；通过 Viracor Eurofins Clinical Diagnostics 获得检测；商品化试剂盒；仅得到 FDA 批准	196-198

注：[a] IFN-γ. γ 干扰素；IE-1. 早期蛋白-1；HLA. 人白细胞抗原；NK. 自然杀伤细胞；NKT. 自然杀伤 T 细胞；IL. 白介素；TNF. 肿瘤坏死因子

许多研究已经证实这些检测的临床应用是评估免疫重建和确定有 CMV 病毒血症高风险和移植后的高发病率的移植受者，指导预防性和先发治疗的临床决策，以及移植前患者的风险分层[46-48,129]。

最近在移植患者 CMV 管理的更新国际 CMV 共识指南中推荐联合使用免疫监测试验和血液中病毒载量定量监测[10]。在具有强烈或增加的 CMV 特异性细胞介导免疫应答的移植受者中出现低或减少的病毒载量，可能提示低发病风险和有停止抗病毒治疗及调整免疫抑制治疗的可能机会。相反，检测到高或增加的病毒载量与低或降低的 CMV 特异性细胞免疫功能，这可能提示 CMV 并发症发病风险高，需要开始或继续抗病毒治疗，开始细胞适应性免疫治疗或调整免疫抑制药物。最近，CMV 特异性细胞免疫应答也被用于对孕妇的评估，研究发现母体 CMV 特异性细胞免疫应答是 CMV 传播给胎儿的一个预测因素[138-139]。

九、抗病毒药物敏感性试验

CMV 对用以治疗或预防 CMV 感染或疾病的抗病毒药物产生的耐药性已经成为免疫功能不全宿主中日益严重的问题[150-152]。在移植受者和 AIDS 患者中延长和重复使用抗病毒药物，被认为与药物耐药性产生和 CMV 疾病进展或复发相关。

CMV 的耐药性是 *UL97* 磷酸转移酶基因催化结构域发生特定基因突变，导致药物磷酸化缺乏，及 UL54 病毒 DNA 聚合酶基因改变的结

果[15,150-151]。*UL97* 基因突变导致病毒对更昔洛韦和缬更昔洛韦耐药，而*UL54* 基因突变导致更昔洛韦、缬更昔洛韦、西多福韦和膦甲酸耐药。对新型抗病毒药物耐药也已经报道，包括由*UL56* 基因突变介导的莱特莫韦耐药，*UL54* 基因突变介导博瑞西多福韦耐药，*UL97* 基因突变介导马立巴韦耐药[15]。由于马立巴韦的耐药突变处于*UL97* 基因上的不同位置，更昔洛韦耐药的 CMV 分离株，仍然保持对马立巴韦敏感，反之亦然。

已报道的抗病毒药物耐药性的出现导致对体外抗病毒敏感性试验的明确需求。在长期抗病毒治疗（平均 5 个月）期间，那些有病毒载量上升、反弹，或持续高的患者，进行药物耐药性的实验室确认是十分重要的，如用于确定抗病毒药物耐药的机制、确定在临床实践中出现耐药 CMV 突变的频率、预测治疗失败及鉴别其他抗病毒药物的交叉耐药，制定最合适的替代疗法，以及评价新的抗病毒药物。在至少累计 6 周或以上的抗病毒治疗，其中包括 2 周以上的持续治疗都是在合适的剂量和给药方式进行，但之后出现新发或加重的 CMV 疾病时，通常应考虑进行耐药性试验[10,15]。已经有一些表型和基因型检测方法的报道，用于测定 CMV 对抗病毒药物的敏感性[150,153]。

表型检测，更具体地讲，空斑减少试验多年来被认可为参考方法。这些试验测定在不同浓度抗病毒药物存在下细胞培养基中 CMV 生长的能力。它们提供了直接检测 CMV 对任何抗病毒药物敏感性的显著优势，并且可以提供抑制病毒复制所需要药物浓度的数据。有效剂量通常定义为导致空斑形成减少 50%的剂量。表型检测通常需要在试验前于培养细胞中分离和传代至高滴度的病毒，这对于野生型 CMV 分离株是相当困难的。而且由于该方法繁琐、费力、昂贵，又由于 CMV 在培养中生长非常缓慢造成检测周转时间太长导致报告与临床相关性脱离，该试验至今仍很少用于临床实践。此外，这项检测较为主观，没有很好地标准化，这可能导致不同实验室内部和实验室之间的显著差异。

基因型检测是目前测定 CMV 抗病毒药物敏感性的首选方法，它对多种临床样本，包括全血、血浆、其他体液和组织标本或 CMV 分离株，提供快速、客观、灵敏和有效的直接筛查和分析，它可以比表型检测更早发现耐药性的出现。它们被设计用来识别已知耐药突变，现有基因型测试通常包括用于 CMV *UL97* 磷酸转移酶基因和 *UL54* DNA 聚合酶基因突变的鉴别，这些突变可以导致病毒对更昔洛韦、缬更昔洛韦、膦甲酸和（或）西多福韦的耐药。这种测定通常涉及运用 PCR 扩增特异性病毒基因和扩增产物测序以鉴定多态性；一些试验用特异性探针来检测所选择的突变，或者用限制性核酸内切酶消化扩增产物来鉴别已知的与特定抗病毒药物耐药相关的病毒基因组改变。与特定耐药基因突变相关的表型信息已有发表，当怀疑或证实耐药时可有利支持使用特定治疗方案[150]。这特别适用于明确的 UL97 或 UL54 突变所致难治性或耐药 CMV 感染的管理[15]。

已经研发出更新的基因型检测方法，涉及直接从标本进行自动测序的方法而无需进行 PCR 扩增[154-155]；为得到最可靠结果，它们通常需要 CMV DNA 最低含量为 1000 拷贝/ml，可能无法检出占病毒种群 20%～30%的突变株。下一代（二代）测序和深度测序方法现在被用于克服这些限制，并对小变异体和新出现的突变亚群提供更加灵敏的检测方法[156-157]。为了快速解释来自 CMV 基因型耐药测试的测序数据，研发出一个名为“Mutation Resistance Analyzer”的基于网页的搜索工具；这一工具可以将测序结果与一个包含所有已发表的*UL97* 和*UL54* 基因突变和相应抗病毒药物敏感性表型的数据库相连接[158]。目前基因型检测的主要缺点是只能测定已知耐药突变，结果会被那些与耐药并不相关突变的出现而混淆。就这一点而言，仍需要通过表型检测来鉴别那些具有新的抗病毒药物耐药性突变的耐药病毒，但现在涉及将突变序列通过基因传递到适应实验室的 CMV 参考毒株或人工克隆系统用于快速重组表型分析[153]。

表型及基因型检测具有的整体复杂性导致这两种方法都不是多数临床实验室的常规方法，这些试验主要用于专门的参考实验室。此外，有效针对 CMV 的新型抗病毒药物的持续研发和这些药物在临床运用后的耐药性出现，将有必要持续更新抗病毒药敏试验。

十、结果的评价、解释和报告

在选择用哪种试验用于 CMV 检测时有许多

要素要考虑。常规试管培养特异性较高,并有可能检测出未预期的病毒。但当考虑 CMV 为原发病原体时,该方法通常太慢且不敏感,从而临床决策影响甚微。壳瓶培养虽然减少了 CMV 分离培养所需时间,但其敏感性随标本类型及不同实验室间而变化。在没有真正 CMV 疾病时,也常有培养阳性,这种情况特别常见于尿或呼吸道标本筛查 CMV 时,因为在无感染症状时 CMV 排毒很常见,通常并不能提示为更严重的疾病。培养分离 CMV 可能对于产后和出生之前诊断先天性 CMV 感染和组织侵袭性疾病具有价值,而且 CMV 分离株可用于特定的抗病毒药物敏感性表型检测。

对于免疫功能不全患者,用直接检测法来诊断 CMV 感染疾病最有利于患者的诊疗。但是,CMV 的病毒学和血清学试验能提示感染但不能确定是否患者现有症状是由 CMV 感染引起。CMV 无处不在,在不进展发病的患者中无症状排毒量是很高的。在有明显症状的患者中,潜伏病毒再激活也很常见,发病患者可能同时存在其他病原感染。为了确定 CMV 是某一种疾病的病因,需要在合适的临床背景下进行活动性疾病的实验室确认。在这方面,大多数临床病毒学实验室对血液已经使用 CMV pp65 抗原检测,或者在更大程度上,使用分子检测法,进行 CMV 准确检测和(或)定量,极大地取代了传统试管和壳瓶培养系统。CMV 抗原血症或 CMV DNA 血症的定量测定可以提供确定疾病的快速诊断,鉴别有新发或复发疾病患病风险的患者,以及评估疾病进展和症状消除。它们也有助于指导先发治疗的启动,监测预防性或先发抗病毒治疗的效果,预测治疗失败和药物耐药病毒的出现。

目前评估病毒载量随着时间变化趋势和测定病毒载量随着时间上升速率,比解释与确定临界值相关的单次检测结果更有价值,这是因为初始病毒载量、载量上升速率和持续时间可以预测 CMV 疾病和可能复发的风险,并有助于识别治疗失败。高风险患者的连续病毒载量监测有益于减少抗病毒药物的使用和暴露,有助于更好的成本效益和对药物有效使用的关注。然而,据报道不同移植中心用于监测和管理 CMV 感染的病毒载量检测方法和检测结果使用方法存在显著差异[159],各机构之间的做法需要进一步优化。根据 WHO 国际 CMV 标准校准并获得批准的商业化 CMV 定量分子检测的出现,已经提高了病毒载量检测值的一致性,并允许使用这些检测的实验室间进行比较。

对于结果解释应当慎重,因为并不是所有 CMV DNA 定量水平变化可以反映实质性生物学或临床差异,尤其是当载量变化很小且处在所用试验的预期变异范围内时。3 倍改变($>0.5\ \log_{10}$)通常无法用固有生物学或试验变异解释,可能反映 CMV DNA 血症水平的生物学或临床相关改变。然而,CMV DNA 分子定量检测在敏感性的下限可能具有更大变异,与接近下限的检测结果有 5 倍($>0.7\ \log_{10}$)差异的结果更可能反映重大生物学或临床变化。此外,单次 CMV 病毒血症阳性结果可能不是预测疾病和需要立即抗病毒治疗的依据,特别是对于无症状患者。最后,有症状患者的阴性病毒载量结果并不常常能排除 CMV 疾病,可能在没有可检出水平 CMV DNA 血症的情况下出现终末器官受累,尤其是胃肠道和肺。组织病理检查和(或)PCR 可用于诊断免疫功能不全患者的特定器官侵袭性疾病。然而,组织标本中 CMV 检测结果的解释需谨慎,特别是有合并多种病原体感染的记录时,因为每种病原体在临床疾病中的相对重要性可能很难确定。组织受累程度可能有助于确定在所致疾病中 CMV 的作用和严重性。在移植患者中,特别需要鉴别 CMV 感染与移植排斥反应,因为在活动性 CMV 感染期间需要使用强效免疫抑制药物并可能导致致死性疾病。

在出生前 3 周内进行尿、呼吸道分泌物或其他体液标本的 CMV 分离培养是确诊新生儿先天性感染的传统方法。尿是首选标本,因为它含有更多病毒,可以使病毒在培养中快速生长。PCR 也已经被有效用于发现先天性感染婴儿的尿和唾液中的 CMV DNA[42,160],同时通过抗原检测和 PCR 来检测先天性感染婴儿血液中的 CMV。使用出生时获得的唾液进行实时定量 PCR 检测,现在被认为是出院前没有通过新生儿听力测验的无症状婴儿检测 CMV 相关感音神经性耳聋的高度灵敏和特异的方法[160]。与尿标本相似,感染新生儿可从唾液中排出高滴度 CMV,并且唾液是通过 PCR 进行新生儿筛查最容易采集的标本。通过分子和(或)抗原检测从母体血液白细胞、羊水、胎儿血液和组织中分离或检测病毒,可以为先天性

CMV感染产前诊断提供有价值信息[5,37-38,161]。虽然这些产前检测是母体或胎儿CMV感染的一个敏感性指标,但阳性结果并不能预测婴儿患病。在这一点上,对先天性CMV感染的病毒载量定量检测可以有益于预测症状的结局和指导患者的管理。有研究表明在婴儿早期阶段血液中CMV DNA水平的升高与有症状性和无症状性先天性CMV感染新生儿的听力受损相关[162-163]。同样,实时定量PCR已经用于羊水标本中CMV DNA定量,以预测胎儿和新生儿的转归[164],并在分娩时检测胎儿脐带血以筛查新生儿CMV感染[165]。若在之前没有做过检查的婴儿在3周龄后发现排出病毒,可能是先天性或获得性感染。标准血清学或病毒学试验没有办法区分这些可能性。

一般来说,针对CMV特异性IgG抗体的血清学试验用于急性感染诊断的价值有限,因为结果是回顾性获得且没有疾病预测价值。在怀孕18周母体IgG抗体开始通过胎盘进入胎儿,这影响新生儿CMV感染的诊断。而免疫功能不全患者可能没有正常的免疫反应,或他们可能接受输血或静脉输注免疫球蛋白,而这些制品中可能含有可检出的CMV IgG抗体。虽然如此,CMV IgG抗体由阴性到阳性的血清学转化史对于原发感染诊断是有价值的,可能有利于评估有病毒性疾病症状的孕妇。但是,对于已存在CMV特异性IgG和(或)IgM抗体的孕妇,IgG亲和力试验可能更有助于区分原发感染或非原发感染,并预测CMV是否传播给胎儿。任何时候只要可能,CMV感染的血清学诊断应该使用其他病毒学方法来确认。作为确定个体CMV免疫状态的筛选工具,CMV特异性IgG血清学试验具有更为重要的作用。在单份血清标本中检测到CMV特异性IgG提示过去某个时间曾经暴露于CMV。血清抗体滴度阴性可能排除CMV感染。在评估器官供者和受者时,接受血清学反应阳性供者的器官或血液的血清学反应阴性受者发生CMV原发感染和严重疾病的风险增加。因此,了解供者和受者血清学状态,对于确定所用治疗或预防措施,以及对所选择供者或者所提供血液制品的考虑是非常重要的。

在免疫功能不全宿主中,基于免疫技术监测CMV特异性T细胞应答和检测免疫重建可能对于识别CMV病毒血症和疾病高风险患者,制定先发性、预防性和(或)过继性免疫治疗,以及改变治疗和管理决策具有价值。随着免疫监测试验商业化发展和持续标准化,临床实验室应准备广泛采用这项技术。

病毒学方法的应用,包括传统和壳瓶病毒培养、快速直接检测试验和免疫学试验,应结合患者临床评估以提供准确、可靠的CMV感染和疾病诊断,以满足后续开展及早、适当的患者管理和特定抗病毒治疗的及时干预。至关重要的是,医疗保健从业人员和实验室工作人员都必须知道针对不同患者群体,哪些CMV试验最合适,并全面了解每项试验的优点和局限,以及试验结果的意义。

参考文献请扫二维码查阅

第103章 Epstein-Barr病毒

BARBARAC. GÄRTNER, FAUSTO BALDANTI

（杨天赐、林勇 译；徐修礼、周柯、钱渊 审校）

EB病毒（Epstein-Barr virus, EBV）与广泛多样的疾病状态相关，从传染性单核细胞增多症（infectious mononucleosis, IM）到恶性肿瘤。抗体测定主要用于对疑似传染性单核细胞增多症病例，已经有多种免疫学检测、印迹试验和流式细胞术在使用。目前更倾向于采用针对病毒衣壳抗原（viral capsid antigen, VCA）的IgG和IgM，以及EB病毒核抗原1（EBNA 1）IgG测定。其他检测方法，如亲和力试验（avidity testing）和病毒载量（viral load）测定对于IM的诊断几乎没有必要。异嗜性抗体（heterophile antibodies）测定对于具有典型IM症状的年轻成人偶而有用，但该试验常常缺乏敏感性和特异性，尤其针对小龄儿童群体或当症状不典型时。由于试验之间异质性的存在和特异性差，采用抗体检测早期抗原（early antigen, EA）在诊断中几无价值。在外周血中采用定量核酸检测技术（quantitative nucleic acid amplification test, QNAAT）检测EB病毒，主要用于移植受者或EB病毒相关恶性肿瘤患者。EB病毒DNA监测在为临床提供启动高危移植受者移植后淋巴组织增生性疾病的预防性治疗指导，以及鼻咽癌（nasopharyngeal carcinoma, NPC）的诊断和治疗监测方面有最好的循证依据。通过国际标准参考值的建立，极大降低了病毒载量测定结果的差异性。将定量核酸检测数值用于干预治疗的触发点仍处于探索中，该数值可因样本类型、临床情况及患者分组而变化。观察病毒载量的动态变化在患者的治疗中至关重要，而不是仅仅关注核酸检测结果的绝对值。

一、分类学

EB病毒属于疱疹病毒科（Herpesviridae），丙型疱疹病毒亚科（Gammaherpesvirinae subfamily）[1]。EB病毒和另一种人类病原体——人疱疹病毒8具有极高相关性，它们均在上皮细胞中复制，并长期潜伏于淋巴细胞中。尽管如此，EB病毒是唯一属于淋巴细胞潜隐病毒属（Lymphocryptovirus）的人类病原体，而人疱疹病毒8属于猴病毒属（Rhadinovirus）。

二、病原体描述

从形态学看，EB病毒是由富含脂质包膜包裹的，含有162个呈二十面体排列壳粒的典型疱疹病毒。病毒基因组由172 kbp的双链DNA分子构成，既可以线性形式存在于成熟病毒颗粒中，也可以环状体形式存在于潜伏感染的细胞中。该基因组包含一系列由交替的内部重复序列形成的独特序列，所有这些独特序列被夹在环化过程中结合进来的2个末端重复元件中间。病毒DNA整合到宿主染色体DNA中很少见，已有文献报道的主要是整合到淋巴母细胞系染色体DNA内。

EB病毒主要感染未经抗原刺激的初始B细胞（naïve B cells），这一过程需要病毒主要外膜糖蛋白gp350/220与细胞补体受体C3d（也称为CD21或CR2）的结合，同时需要外膜糖蛋白gp42与主要组织相容性复合体Ⅱ分子的结合。在宿主体内，EB病毒利用具有高度可调性、有序表达的蛋白（见后文阐述）来维持其在宿主体内的持续感染和传播，被认为是通过霸占正常B细胞的生理功能来实现。EB病毒通过取代抗原、辅助T细胞、B细胞受体及其他信号，引起细胞激活、增殖、分化和存活，当初始B细胞接触到抗原，用模拟的旁路在记忆性B细胞中建立潜伏状态[2]。在体外

(试管内),EB病毒可使B细胞转化为淋巴母细胞系。虽然口咽部的CD21-阴性的上皮细胞为病毒复制和扩增最主要的部位[3],但是EB病毒也可高效地感染单核细胞[4-5]。在某些临床病例中,还证实了EB病毒可感染T细胞和NK(自然杀伤)细胞[6]。EB病毒的核抗原EBNA 1、EBNA 2、EBNA 3(也被称为EBNA 3a)、EBNA 4(EBNA 3b)、EBNA 5(EBNA LP)和EBNA 6(EBNA 3c),以及潜在的膜蛋白(LMP1、LMP2A、LMP2B)均可在B细胞中表达。基于潜伏期相关蛋白表达量的不同,定义了4种类型的B细胞潜伏状态[7-8]。0型潜伏期,仅仅表达了EB病毒编码的RNA(EBV-encoded RNAs,EBERs)和BamHI *A* 基因的右向转录物。EBER1和EBER2为非多聚腺苷酸的RNA,因此无法被翻译成蛋白质,其作用在于抑制干扰素的抗病毒效应和抑制凋亡。EBERs几乎在所有EB病毒感染细胞中都具有较高的拷贝数(10^6～10^7)。这种表达特征在健康携带者的记忆性B细胞中同样可见。Ⅰ型潜伏期是在0型潜伏期表达特征的基础上,可以检测到EBNA 1,在伯基特淋巴瘤病例中可观察到这一现象。Ⅱ型潜伏期表达LMP1和LMP2,以及Ⅰ型潜伏期的基因产物,见于扁桃腺及包括霍奇金淋巴瘤、鼻咽癌、鼻NK细胞淋巴瘤、慢性活动性EB病毒感染和鼻咽部淋巴瘤等恶性肿瘤的生发中心和记忆性B细胞中。最后,Ⅲ型潜伏期可检出所有EBNA蛋白,见于急性感染时扁桃腺的初始B细胞和免疫缺陷相关的淋巴细胞增殖性疾病[2]。

EB病毒具有非常严格的宿主范围。尽管在急性EB病毒感染中,大约有10%循环B细胞,即50%或更多记忆性B细胞可能被感染,然而对一个未感染病毒的健康人而言,每百万个EB病毒基因组仅仅可能有1～50个B细胞被感染[9]。在溶细胞性复制过程中,有70种以上蛋白表达(包括诊断试验中常用的VCA和EA),这些蛋白表达主要发生在上皮细胞和处于浆细胞样分化的B细胞中。

三、流行病学与传播

事实上每个人在一生中的某个时段都曾被EB病毒感染。在低社会经济阶层和发展中国家中,EB病毒感染主要发生在出生后的头几年,常表现为亚临床感染。而在发达国家,特别是高社会经济阶层中,仅有60%人群在青春期前发生感染,在这些情况下,感染常发生在青少年和成年早期,继而导致23%～89%病例发生IM症状或非典型症状感染[10]。因此,在20岁时90%的人EB病毒血清学反应为阳性,而到40岁人群几乎99%血清学阳转。

在青少年和成年人中,EB病毒主要通过唾液交换传播,特别以深吻为主[10]。EB病毒可从既往感染的宿主的唾液中连续、持久且快速排出[3,11],因此不主张采用唾液诊断EB病毒急性感染。尽管通过血液制品传播的感染是可能的,但血液制品作为EB病毒感染来源的重要性并不明确,尤其是血液制品通常都已去除白细胞。

在移植受者中,EB病毒潜伏感染的细胞从血清学反应阳性的供者器官或造血干细胞传染至血清学反应阴性的受者,成为移植术后早期最重要的感染源。

根据 *EBNA* 2基因多态性,可将EB病毒株分为1、2型(也称为A、B型)。2个型别的EB病毒在全球分布广泛,各自在不同地域占据主导优势。2个型病毒的双重感染并不少见。在免疫抑制人群中已被证实存在多重EB病毒株的混合感染[12]。

四、临床意义

EB病毒与免疫功能正常和免疫抑制人群的多种疾病状态具有相关性。一项对于EB病毒急性感染的非洲儿童的纵向研究提示,由于年龄相关性的免疫力发育不成熟,出现在非常早的年龄(6个月以内)无症状感染可能与外周血更高更持久的病毒载量相关;同时,提出了出生后早期感染EB病毒与患伯基特淋巴瘤的风险存在相关性的假说[13]。被动母源抗体可在出生早期提供抗病毒的保护性作用,尽管其保护期限尚不确定[14]。

IM被认为是一种免疫病理性疾病,临床症状源于较成熟免疫系统对于自限性淋巴细胞增生过程和外周高病毒载量的失控的T细胞反应。在该模式中,EB病毒DNA阳性先于临床症状显现[15]。在那些具有急性EB病毒感染症状的青年人中,在症状显现后的1周内血浆中的EB病毒DNA(可能代表病毒粒子)可被快速清除,但在全血中,病毒DNA(可能代表潜伏感染的B细胞内

游离 DNA)需要长达 200 天甚至更久才能被清除而达到健康携带者水平[10,15-16]。

IM 症状可轻可重,一些数据表明最初感染病毒的方式、病毒型别(1 型还是 2 型)及人类白细胞抗原 1 类分子多态性均可能是有症状性疾病的危险因素[17-19]。IM 典型三联征包括发热、咽喉疼痛和淋巴结肿大;常见症状和体征包括咽炎、扁桃体炎、肝炎、脾肿大及伴有异型淋巴细胞的淋巴细胞增多症。约有多达 15%IM 患者可出现多形性皮疹[20]。先前认为使用抗微生物药物,尤其是使用氨苄西林或阿莫西林的 IM 患者有超过 80%的比例出现抗微生物药物相关性皮疹[21]。但一项新近开展的研究表明该比例被远远高估了,使用抗微生物药物治疗的患者出现皮疹的比例仅比未使用抗微生物药物的患者略高[22]。抗微生物药物相关性皮疹并不预示着将来出现药物不耐受。

从病毒感染到症状出现的时间间隔相对较长,为 30~50 天[15,23],临床疾病期通常持续 1~4 周或更久。然而,迁延不愈、感染后疲乏和(或)抑郁持续达 1 年之久的情况并不少见[24]。非典型的临床表现,在血液系统可表现为贫血(包括自身免疫性溶血性贫血、血小板减少症),在神经系统可表现为脑膜脑炎、脊神经根炎和单神经炎。当伴有内脏器官受累时,几乎由任何一个受累器官的炎症引起的相应症状都可观察到(IM 症状的多样性)[25]。由 IM 导致的死亡罕见,但却有相关报道,多由脾破裂[26]、气道阻塞或神经系统并发症[25]所致。噬血细胞性淋巴组织细胞增生症是一种原发感染伴随的严重的、有时是致死性的并发症,它是一种以病毒驱动 T 细胞引起无法控制的巨噬细胞激活和吞噬作用为特征的噬血细胞综合征。这些患者外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cell,PBMC)和血清中均可检测出极高载量的 EB 病毒 DNA[6,27-28]。其非典型表现如急性胆汁淤积性肝炎,在急性 EB 病毒感染的中年患者(年龄大于 40 岁)比较常见,容易被误诊为急性胆囊炎[29]。健康人群携带的 EB 病毒通常会出现再激活,但尚不清楚再激活与哪些症状相关。

值得注意的是原发性 EB 病毒感染仅引起 50%~90%的 IM 症状[29]。其他感染因子如急性巨细胞病毒、腺病毒、刚地弓形虫和人类免疫缺陷病毒(human immunodeficiency virus,HIV),以及淋巴瘤和自身免疫性疾病同样可引起与 EB 病毒相关的 IM 相似的症状和体征。

在体外,阿昔洛韦、更昔洛韦和膦甲酸均可通过阻断病毒 DNA 聚合酶抑制 EB 病毒复制,但这些抗病毒药物在体内的效果尚不明确。此外,传染性单核细胞增多症的致病机制更像是由免疫介导(至少部分是),通过抗病毒治疗去抑制病毒的排出已经证明对症状改善几乎没有或少有作用。实际上,一项荟萃分析表明应用阿昔洛韦治疗 IM 仅能获得不明显的改善[30],因此,不再推荐采用抗病毒药物治疗非重症的 IM。有关类固醇治疗非重症 IM 的荟萃分析亦表明类固醇使用无明显效果[31],但类固醇可能对于具有并发症或者严重病例有效[25]。无并发症的 IM 通常仅给予支持治疗。重要的是,对脾脏的损伤必须要避免。

慢性活动性 EB 病毒感染是一种少见且严重(常常致命)的 EB 病毒相关性疾病,其报道常见于亚洲儿童。该病被认为是 T/NK 细胞淋巴瘤发生的前驱状态[32]。该病以 EB 病毒感染的 T 细胞和 NK 细胞的克隆性扩张,以及 PBMC、血清与血浆的高病毒 DNA 载量为特征。血清与血浆 EB 病毒 DNA 被认为是游离 DNA 而不是病毒颗粒结合的 DNA。患者常常具有不典型的针对 EA 的抗体模式[6,33]。尽管曾尝试化学治疗和免疫调节治疗,但大部分病例表现为化疗耐药。如今,造血干细胞移植(HSCT)成为首选治疗选择[6,34]。

EB 病毒具有高度致癌性,且与多种累及多层胚胎层(中胚层和内胚层)的肿瘤密切相关(表 103-1)。EB 病毒的致癌潜能主要是依靠其潜伏基因能够模仿多种生长因子、转录因子及干扰细胞凋亡因子而实现的(表 103-2)。此外,EB 病毒转化的细胞可通过抑制主要组织相容性复合体信号通路和利用 PD-1/PDL1 信号通路(表 103-2)逃避 T 细胞的识别。EB 病毒相关肿瘤主要为淋巴和上皮来源,与明显的免疫抑制并无关联。另一方面,HIV 感染和移植受者接受抗排斥治疗所造成的免疫功能受损可强烈促进 EB 病毒诱导的移植后淋巴组织增殖性疾病(PLTD)、淋巴瘤、平滑肌肉瘤的发生。免疫受损患者鼻咽癌的发病率较高。最后,EB 病毒和与其密切相关的卡波西肉瘤疱疹病毒(人疱疹病毒 8 型)通常在某些患有罕见型淋巴瘤(如多中心卡斯特曼病或原发性渗出性淋巴瘤)的免疫缺陷患者中共同存在。

表 103-1　EB 病毒相关肿瘤与 EB 病毒潜伏基因的表达[a]

EB 病毒潜伏类型	EB 病毒潜伏基因的表达	恶性肿瘤	胚层起源
Ⅰ型	EBNA-1	伯基特淋巴瘤	中胚层
	EBERs	胃癌	内胚层
Ⅱ型	EBNA-1	鼻咽癌	内胚层
	LMP 1,2A,2B	霍奇金淋巴瘤	中胚层
	EBERs	鼻 T/NK 淋巴瘤	中胚层
Ⅲ型	EBNA 1,2,3A,3B,3C,LP	AIDS 相关非霍奇金淋巴瘤	中胚层
	LMP1,2A,2B,EBERs	移植后淋巴组织增殖性疾病 PLTD	中胚层
其他型	EBNA1,2,EBERs	平滑肌肉瘤	中胚层

注:[a] 根据参考文献[180]进行调整

表 103-2　EB 病毒基因表达产物与它们在肿瘤发生中的作用[a]

EB 病毒基因表达产物	功能
EBNA1	序列特异性 DNA 结合蛋白,是溶解周期内通过病毒聚合酶,以及潜伏期通过细胞聚合酶进行基因组定向复制必需的分子;宿主细胞有丝分裂时 EB 病毒游离(附加体)基因分离所必需的分子;蛋白酶体干扰作用;免疫逃逸
EBNA 2	上调 CD23 和 c-myc,与 Notch 信号通路相互作用;细胞永生化
EBNA 3A	与 CBF1(Notch 信号通路)相互作用;细胞永生化
EBNA 3B	与 CBF1 相互作用;对于细胞永生化非必需
EBNA 3C	与 CBF1 相互作用,干扰 pRB,上调 LMP-1;细胞永生化
EBNA LP	与EBNA-2 相互作用以干扰 pRB 和 p53,与 Notch 信号通路相互作用;细胞永生化
LMP 1	模仿持续活化的 CD40 受体,上调 Bcl-2;细胞永生化;上调 PDL1;免疫逃逸
LMP 2A 和 LMP 2B	维持潜伏状态
EBERs 1 和 2	潜伏相关转录
BCRF1(vIL10)	模仿白介素 10 的功能;免疫逃逸
BNLF2a	干扰 TAP1;免疫逃逸
BARFs	与 Notch 信号通路相互作用;对于细胞永生化非必需

注:[a] 数据来源于参考文献[35][181-183]

已在多种肿瘤细胞内发现 EB 病毒基因组,包括>95%的地方性伯基特淋巴瘤和鼻咽癌,5%～70%的霍奇金淋巴瘤(根据其亚型),2%～16%的胃腺癌,40%～90%的 T/NK 细胞淋巴瘤(根据其亚型),以及 40%～95%的淋巴上皮瘤样癌[35]。

在最近发表的一篇综述里,Thorley-Lawson 详尽地描述了 EB 病毒的潜伏遗传程序是如何模仿正常 B 淋巴细胞的遗传程序,以及在不同成熟阶段时的 B 淋巴细胞由于 EB 病毒叠加的基因所造成的程序重排可能导致不同类型 B 细胞淋巴瘤的发生,其基础是共刺激(伯基特淋巴瘤患者感染疟疾)和跨越特异的细胞周期检查点[36]。

由于 EB 病毒的溶解周期对 EB 病毒相关肿瘤(EBV-associated tumors)的生成影响十分有限,因此目前抗病毒药物(靶点为病毒 DNA 聚合酶,后者在病毒潜伏期无活性)对于控制这些恶性肿瘤的效果尚不明确。因此,标准化肿瘤治疗可用于这类恶性肿瘤的控制,基于有效的天然和适应性细胞免疫控制机制,EB 病毒在大部分感染者体内均可无症状持续存在[37]。采用针对 EB 病毒相关的恶性肿瘤表达的特异性 EB 病毒蛋白的过继性免疫治疗已经在一部分患者中取得成效,并正在临床试验中进一步探索[38-42]。最初有不正式报道表明 EB 病毒在慢性炎症性肠病[43]的恶化过程中发挥作用,这一说法得到最近新开展的涉及生物制品使用的免疫抑制疗法的支持[44-47]。

原发性免疫缺陷及其原型疾病——X 染色体连锁淋巴细胞增生综合征,均是罕见的遗传性免

疫缺陷病，主要涉及 T 细胞和 NK 细胞失去了对 EB 病毒感染的 B 细胞活化能力[48-49]。由于 EB 病毒对于 B 细胞的高度选择性，EB 病毒暴露后的患者容易出现相关症状，引起急性致死性 IM 或淋巴组织增生性疾病和(或)异常丙种球蛋白血症。对于某些免疫功能低下的患者，其遗传缺陷已被发现。如果未采取治疗，这些疾病通常是致命的，但患者可从干细胞移植中获益[50]。对于这类患者在急性 EB 病毒感染早期应用抗病毒治疗效果不确切，已有一些研究者提倡用抗 CD20 抗体进行治疗。在一些免疫功能低下的患者中，EB 病毒原发性感染及再激活都可引起淋巴组织增殖性疾病。PTLD 代表一系列疾病，包括从良性多克隆增殖到真性恶性肿瘤如克隆性染色体异常。PTLD 常发生于淋巴结外，仅局限于实体器官移植(solid-organ transplantation，SOT)的同种异体移植物内，不像免疫功能正常患者的淋巴瘤可单独累及脑组织或成为多系统疾病的一部分。其主要危险因素包括：①实体器官移植后的 EB 病毒原发性感染；②实体器官移植和造血干细胞移植出现严重的 T 细胞耗竭(例如，应用抗 T 细胞的抗体或操作移植物进行灌注后)[51-53]。尽管在大于 90%实体器官移植后的早期(移植后 1 年内)PTLD 病变中可检测到 EB 病毒，而大于 50%的晚期 PTLD 患者的 EB 病毒检测为阴性[54]。目前认为在 PTLD 晚期 EB 病毒的消失可能反映了在早期多克隆阶段该病毒本身具有促进细胞复制的作用，而后来在寡克隆和单克隆淋巴细胞增殖中出现的染色体异常本身可能是为了维持失控的细胞增殖。旨在控制 EB 病毒诱发 PTLD 的过继性免疫治疗策略，主要针对处于增殖中的细胞中的病毒抗原，因此，其在进展期 PTLD 的效果可能不佳。近年来，PTLD(尤其是 EB 病毒阳性的 PTLD)的发病率显著下降，这一现象反映了在优化免疫抑制方法和由于 EB 病毒 DNA 监测而采取预防措施所取得的进展[55]。EB 病毒相关淋巴瘤(EBV-related lymphomas)也是 HIV 感染及获得性免疫缺陷综合征(AIDS)患者常发的恶性肿瘤。伯基特淋巴瘤、中枢神经系统(central nervous system，CNS)淋巴瘤及平滑肌肿瘤均与 EB 病毒感染密切相关(相关性高至 90%)[56-57]，而平滑肌肿瘤在移植受者也可见到[58]。口腔毛状白斑可见于 HIV 感染患者及使用类固醇激素吸入装置的呼吸系统疾病患者舌外侧缘的一种白色、非恶性病变，与 EB 病毒溶细胞性感染有关，抗病毒治疗有效[59-60]。

某些经历过 EB 病毒原发性感染或 PTLD 的实体器官移植受者，在无症状感染后，或 EB 病毒疾病与 PTLD 发生缓解后，其血液中 EB 病毒 DNA 载量仍然持续升高[61-62]。这些患者表现为慢性的高病毒 DNA 载量表型。尽管一项关于小儿胸科实体器官移植的研究提示，45%的慢性高病毒载量表型患者在中位随访时间达 7 年出现迟发性 EBV 阳性的 PTLD[63]，患病风险似乎呈现器官特异性，肠道实体器官移植后患者的风险为中度[64]，而在同一移植中心的肝实体器官移植后患者为低风险[62]。这种 EB 病毒 DNA 在血液中持续的存在同样可在 HIV 感染的儿童和成人中观察到。已在该群体观察到个体患者和 EB 病毒感染 NK 细胞、T 细胞时的血液 EB 病毒 DNA 阈值[65]。这种 EB 病毒感染状态的发病机制仍不清楚。这种慢性 EB 病毒高 DNA 载量未进展到 EB 病毒相关疾病，可能预示着免疫系统尚能控制 EB 病毒引起的细胞增殖，尽管其免疫水平低于免疫功能正常人群[61]。

对 PTLD 的预防和治疗非常复杂，它需要多学科团队的合作，包括移植内科医生、感染性疾病专家、病毒学家及血液病学家/肿瘤学家，关于这个问题在别处已有综述[66-69]。治疗方法包括通过降低免疫抑制(仅预防 PTLD)和过继性免疫治疗以重建免疫功能，通过手术或放射治疗减少肿瘤负荷，以及采用化疗药物和生物制品，特别是抗 CD20 治疗和细胞毒性药物化疗[54,70]。

尽管抗病毒药物联合或不联合免疫球蛋白静脉注射用于 PTLD 的治疗，但没有证据表明这些药物能够对临床转归产生影响。当 PTLD 出现临床病损时，潜伏感染细胞几乎占据主导因素。先前使用的联合治疗策略，通过将作用于 EB 病毒溶解周期的抗病毒药物与在潜伏感染 PTLD 细胞中诱导 EB 病毒溶细胞性复制的药物(如丁酸精氨酸和硼替佐米)进行联合，但这种方法已经不再使用，因为有多种其他治疗方案可供选择[71]。从理论角度，应用抗病毒药物及免疫球蛋白静脉注射，对处于移植或社区获得的 EB 病毒感染高风险的那些患者来说，可能会更有效地预防或改善在实体器官和造血干细胞移植后早期发生 EB 病毒原

发性感染或病毒的再次激活。然而，近期一项荟萃分析的结果显示，预防性用药并未取得显著益处，因此，在这些情况下实施预防性应用抗病毒药物还存在争议[72]。重建 EB 病毒特异性免疫反应对于治疗控制 PTLD 至关重要，通常首选采用降低免疫抑制程度[73]。采用 EB 病毒特异性细胞毒性 T 细胞（自体来源或同种异体 T 细胞）的过继性免疫疗法对疾病预防和治疗都确实有效[69,74]。这一疗法促使第三方 T 细胞储存库的出现，如位于 Aberdeen 的细胞库，从健康血液捐献者中收集 T 细胞供实体器官移植者使用[75-77]。

现今还没有批准上市的 EB 病毒疫苗。预防性和治疗用途的疫苗仍在研发中。一些关于 2 种原型疫苗的研究显示这类疫苗并不能有效地预防 EB 病毒感染，但可部分有效地预防症状的出现[78-79]。目前已开展关于使用 EB 病毒疫苗治疗鼻咽癌的研究[80]。

五、标本的采集、运输和存储

在罕见情况下，当需要对口咽部排病毒情况进行研究时，可用 5～10 ml 咽喉漱口液，收集到不含血清的组织培养基或 Hanks 平衡盐溶液内。如需细胞培养来检测 EB 病毒转化的 B 细胞，或通过免疫染色、免疫荧光原位杂交方法（见后文）检测 B 细胞内的病毒抗原，需要 5～10 ml 肝素或 EDTA 抗凝血。尽管用于抗原检测的血样本冷藏保存达 24 h 是可以接受的，血样本采集后还是应尽快处理。如果用于组织的抗原检测，新鲜活检样本或超薄冰冻切片（5 μm）方法要优于福尔马林固定的材料。

核酸扩增试验（nucleic acid amplification test，NAAT）目前最常用于检测血液、脑脊液（cerebrospinal fluid，CSF）和活检样本中 EB 病毒。样本的选择取决于所关注的 EB 病毒相关疾病类型及根据临床背景而选择的检测方法（表 103-3）。举例来说，研究者提倡对慢性活动性 EB 病毒感染患者的外周血单个核细胞[81]，艾滋病相关原发性中枢神经系统淋巴瘤患者的脑脊液肿瘤细胞[82]，以及移植后患者的全血或血浆[83-84]进行取样。血浆（而非全血），被推荐为 IM[11,85] 及那些恶性肿瘤细胞不一定进入血液循环的疾病如鼻咽癌[86]、鼻 T/NK 细胞淋巴瘤[87]和霍奇金淋巴瘤[88]的最佳取样基质。

表 103-3 EB 病毒病与 EB 病毒相关恶性肿瘤的预防、诊断及监测的常用材料和方法[a]

可疑 EB 病毒相关疾病和临床背景	已验证的方法	适合的标本种类	具有临床意义的近似值[b]
传染性单核细胞增多症	血清学	血清	
慢性活动性 EB 病毒感染	定量核酸检测技术	单个核细胞	$10^{2.0}$ U/μg DNA（既往感染患者） $10^{3.2}$ U/μg DNA（IM 患者）[c]
EB 病毒阳性中枢神经系统淋巴瘤	定量核酸检测技术	脑脊液	约 10^4 EB 病毒 DNA 拷贝数/ml[d]
高危患者的移植后淋巴组织增殖性疾病预防性治疗	定量核酸检测技术	血浆	10^2～10^4 EB 病毒 DNA 拷贝数/ml
		全血	10^3～10^5 EB 病毒 DNA 拷贝数/ml
高危群体中的鼻咽癌筛查	定量核酸检测技术	血浆或血清	约 20EB 病毒 DNA 拷贝数/ml（重复检测）
		鼻咽刷检	约 200 EB 病毒 DNA 拷贝数/ng DNA
	血清学试验[e]	EB 病毒特异性 IgA	未定义
鼻咽癌疗效监测	定量核酸检测技术	血清/血浆	未定义
先天性免疫缺陷的诊断，如 XLP[f]	基因检测	宿主细胞	特异性相关基因突变

注：[a] 通过各种病理活检检测 EB 病毒抗原或 EBER 诊断 EB 病毒相关肿瘤；[b] 具有临床意义的 EB 病毒载量的近似水平是基于数据报告取得，大部分来自单中心，使用多种常用非标准化检测方法，仅有少部分研究的数据根据国际参考标准进行校正；[c] 单个核细胞的敏感性和特异性均优于血浆，因为疾病通常由 EB 病毒感染 T/NK 细胞的克隆性增殖引起[70]；[d] 强烈建议对血液病毒 DNA 拷贝数进行平行量化（尤其是在移植患者中），继而评估由于血-脑脊液屏障渗漏或血性脑脊液标本中循环血液 EB 病毒 DNA 对脑脊液的潜在污染；[e] 相比定量核酸检测技术使用较少；[f] XLP. X 染色体连锁淋巴增生综合征

监测移植受者病情及免疫抑制患者的最佳取样基质如今还未明确。尽管如此，在无细胞样本中的EB病毒DNA与活动性感染的相关性可能更好，然而，全血标本和外周血单个核细胞样本具有更好的敏感性，但特异性略差[89]。在恶性肿瘤患者中，血浆样本的EB病毒DNA来源于降解的细胞而非正在复制的病毒[90]。对于个体患者的连续监测尤为重要的是样本基质选择的一致性。检测所需的样本量有所不同，但建议最少提供1 ml血浆或全血。用于分离血清、血浆或外周血单核细胞等血液来源样本采集后应尽快处理。如果转运时间小于24 h，样本在分离前可室温下保存。分离后的样本随后可储存于4～7℃保存数日或冷冻保存。全血样本可在室温下存放数日或冷冻保存而不需要进一步处理，长期保存推荐－70℃冷冻。DNA杂交法检测外周血淋巴细胞EB病毒需要5～10 ml肝素或EDTA抗凝血。

脑脊液定量核酸检测技术已用于诊断EB病毒相关的中枢神经系统疾病，特别是淋巴瘤。无添加剂的脑脊液样本的转运、处理及储存应根据上述用于EB病毒DNA的核酸扩增试验的血液样本处理方法执行，可能的话应提供至少0.5 ml用于检测。建议同时采集与脑脊液配对的血液样本进行EB病毒DNA定量检测，尤其是对于免疫功能受损患者，便于区分鞘内DNA合成和血液污染（注：指脑脊液受血液污染）。

用于病毒核酸或抗原检测的组织（如鼻咽癌患者的鼻咽部刷检样本）及活检样本应该加入生理盐水或平衡盐溶液后收集和冷藏。推荐新鲜采集后直接冷冻样本。对于鼻咽癌患者，内镜引导下的鼻咽毛刷取样是一种重要的样本基质。应使用有塑料套管保护的毛刷避免非鼻咽部位细胞的污染。毛刷头部应置于转运培养基，立即转运至实验室或储存于－80℃。

对于检测异嗜性抗体的抗体试验，全血、血清或毛细管指尖血可用于大部分的床旁检测方法。对于EB病毒特异性检测，50 μl甚至更少量的急性期血清可足够使用，但推荐量为1～2 ml。血浆虽可以用于检测，但血清更适合。血清可在5℃储存达数月，长期储存推荐－20℃或－70℃冻存。

六、直接检测

电子显微镜技术、病毒分离及用免疫组织化学的抗原检测是最主要的研究手段。采用核酸扩增试验为主的分子生物学方法检测EB病毒DNA是最为常见，也是唯一的EB病毒常规直接检测方法。

（一）显微镜技术

电子显微镜并不是一种适合检测EB病毒的诊断技术，因为大部分EB病毒相关疾病都与潜伏感染有关，并且病毒颗粒存在的数量不足以检出。

（二）用免疫组织化学检测EB病毒抗原和用原位杂交检测EB病毒编码RNA

针对多种EB病毒抗原的特异性抗体已经被用于通过免疫组织化学技术检测组织活检样本中的EB病毒抗原。针对EBNA 1、EBNA 2、LMP 1、LMP 2、BamHI H右框架1蛋白（BHRF 1）、BamHI Z左框架1蛋白（BZLF 1）和BamHI M右框架1蛋白（BMRF 1），以及其他抗原的特异性抗体的相关研究先前已有报道[7,91-93]。EBNA 1是唯一表达于所有被EB病毒感染并表达EB病毒蛋白的细胞（处于非0型潜伏期的潜伏感染状态）的抗原。然而，应用现有的EBNA 1抗体通过免疫组织化学技术检测EB病毒感染细胞的敏感性要低于针对EBER的原位杂交技术[7]。无论何种潜伏状态，EBER在EB病毒感染细胞中以高拷贝数表达，这使得检测EBER的原位杂交技术成为检测组织和肿瘤中EB病毒感染细胞的理想方法和“金标准”[94]。尽管如此，还是有一些学者报道发现了EBER阴性的EB病毒感染细胞[95]。

可通过采用细胞表面蛋白（细胞表型）免疫荧光染色与以EBER[96-97]或其他靶分子[98]为核酸探针的原位杂交等联合检测，来研究具有持续高病毒载量患者外周血中EB病毒的“嗜细胞性”。这些检测可通过载玻片显微镜检测，或应用细胞悬液进行流式细胞检测。目前常规诊断实验室还不具备这些检测方法。

（三）核酸扩增试验

分子技术是检测临床样本中EB病毒的重要

工具。方法和临床样本的选择取决于所要解答的临床问题(表103-1)。

直接检测EB病毒DNA的临床诊断试验可使用来源于各类临床样本中提取的DNA。目前已有多种引物、探针和技术手段得到应用。总的来说,病毒载量的定量分析优于定性检测,并且已有多种商业化检测可供使用[99-100]。实时荧光定量PCR技术是目前在具有EB病毒相关疾病患病风险患者中检测病毒载量最常用的技术。先前的研究证实在某些实验室之间结果都具有显著变异度(4 log_{10}),制约了各实验室间结果比对的有效性[101]。在2011年10月,世界卫生组织(World Health Organization,WHO)批准了第一个EB病毒国际标准品(一个用EB病毒B95-8株制备的全EB病毒制剂,效价为5×10^6 U/ml),由英国国家生物制品标准和质控所(the National Institute for Biological Standards and Controls,United Kingdom)研制[102]。

根据所要检测的基因组区段的不同,可将病毒载量分析划分为2个基本种类:①保守的BamHI W区段,编码EBNA 1的一个长的内部重复序列,在EB病毒感染的细胞具有不同的拷贝数(7~11个拷贝)。针对这个靶区段的核酸扩增试验在临床样本检测中具有最高的敏感性[103]。②因LMP 1或胸苷激酶基因,或*EBNA* 1基因的其他部分为单拷贝区段,常作为定量PCR的靶区段[104]。最近发现当采用国际标准品校正后,2种方法对于病毒载量的结果差异在0.5 log_{10}左右[103]。但值得注意的是,国际标准品采用B95-8毒株,该毒株具有11个BamHI W区段[103],但临床所检测到的病毒株可能具有的区段拷贝数较少。即便是使用单拷贝基因的核酸扩增试验之间,仍然可以得到有差异的靶基因特异的定量检测结果[105-108]。当测定血浆样本中病毒DNA时,产生一些小扩增子的靶基因可能更为有用,因为血浆中EB病毒DNA常为游离DNA,而不是被衣壳所包裹,所以可能为高度片段化的DNA[90,109]。

为了准确量化,标准品应在与临床样本相似的基质中与临床样品同时提取。标准品不应该以缓冲液稀释,虽然国际参考标准品是通过去除核酸酶的水来复融的。迄今为止,大部分的商业化的核酸扩增试验均根据国际参考标准品进行矫正,显著降低了不同试验之间的结果差异[110-112]。但是这些研究指出标准品不是影响结果一致性的唯一因素,所选用的商业化试剂和靶基因都可能造成结果的差异[111]。实际上,采用基于世界卫生组织制定的国际标准的标准化策略,并考虑到所有的技术差异,这一措施证实有助于将各中心的结果变异度降低到0.5log_{10}[113]。

结果应该以"U(国际单位)/ml"报告。当检测全血或脑脊液样本时,在常规诊断中通常没有必要对病毒载量根据"细胞数目或DNA微克数"进行标准化。研究表明检测全血时,以"拷贝/ml"报告的结果和以"拷贝/μg DNA"报告的结果具有密切相关性。同时可以观察到以2种结果报告的同一患者结果具有相似的动态变化趋势,提示含细胞样本的检测结果可能没有必要以细胞数或基因组DNA来标准化[114-115]。用含细胞样本如外周血单个核细胞、B细胞及全血测得的病毒载量之间具有强相关性[116],但上述结果与由血浆或血清测得的病毒载量值之间的相关性较差。活检样本结果应以"U/μgDNA"来报告,当同时扩增一个细胞的单拷贝基因时结果应以"U/每*n*个细胞数目"来报告。

对EB病毒核酸扩增检测的准确度描述如下:其检测值至少改变3倍(0.5 log_{10} U/ml)才代表病毒复制发生了有生物学意义的重要改变。在低病毒载量时的定量核酸检测技术变异度最大,因此,当病毒载量值达到或接近可定量的下限,定量核酸检测病毒载量变化值可能必须大于5倍以上(0.7 log_{10} U/ml)才被认为有意义。

在检测过程中应总是纳入对提取、污染和抑制的合适质量控制措施。参与外部质量控制计划是对所有临床诊断实验室的强制性要求。欧洲(例如,分子诊断质量控制协会;http://www.QCMD.org)和北美(美国病理学家协会;http://www.cap.org)均能提供能力考核测试物。

七、分离、鉴定和分型的步骤

现今EB病毒分离在诊断实验室不是常规项目。将经过滤不含细胞的唾液或咽喉部漱洗液标本接种到新鲜分离的人脐血淋巴细胞并观察4周。利用二代深度测序技术对EB病毒分离株进

行直接测序的技术也正在被开发用于临床样本中病毒株的直接分型[117]。然而，目前还没有数据能够根据EB病毒毒株多态性清晰预知患者临床病程或治疗效果，因此，EB病毒基因分型在临床实践中并不适用。

八、血清学试验

(一)异嗜性抗体

异嗜性抗体(heterophile antibodies)不是EB病毒所特异的。检测异嗜性抗体的实验依赖于检测与非人类的动物红细胞发生反应的抗体，这种抗体的产生源于IM患者中发生的多克隆B细胞刺激。以往，绵羊红细胞曾被用作检测对象(Paul-Bunnell试验)，但这些检测缺乏敏感性[118]。而后增加了Davidsohn鉴别试验，其利用马红细胞来提高特异性，以区分由EB病毒引起的反应和在血清病、风湿性疾病可见的嗜异性反应(即针对Forssman抗原)。为了排除异嗜性抗体针对非EB病毒Forssman抗原引发的凝集反应，在Davidsohn鉴别试验中，待检血清首先用表达Forssman抗原的豚鼠肾细胞吸附，去除这些非EB病毒相关的异嗜性抗体。作为额外对照，待检血清还需用不表达IM抗原的牛红细胞来进行吸附。当这2种吸附后的血清与绵羊或马红细胞混合后，如豚鼠细胞吸附过的血清发生更强的凝集则表明结果阳性。

应用红细胞抗原的乳胶凝集试验是目前用于异嗜性抗体检测具有高特异性的方法[118]。虽然这些试验都可用于实验室检测和床边检测，凝集试验可能不适用于未经过实验室培训的人员使用。由于一段时间后自发性凝集会不可避免地发生，判断真阳性凝集结果需要经验。因此，在床边检测中免疫层析法较凝集试验而言判读更简单，操作更容易[118]。

(二)EB病毒特异性抗体

应用EB病毒特异性检测的血清学试验仍然是作为诊断或排除EB病毒感染的所选方法(表103-4)[119-120]。这些检测的不同之处在于方法、抗原和所检测抗体的同种型。尽管免疫荧光检测(immunofluorescence assay, IFAs)及免疫印迹技术更加可靠，但酶免疫检测(enzyme immunoassay, EIAs)和化学发光检测(chemiluminescence assays, CLIAs)最常使用。

表103-4 用于EB病毒诊断的商品化试剂概况[a]

方法	产品数量	试剂盒间的区别	优势	局限性
异嗜性抗体：玻片凝集试验				
异嗜性抗体：免疫层析试纸条检测	约40种试剂盒	多数为乳胶颗粒；少数为牛、马或绵羊红细胞	非常快速(<15 min，廉价) 非常快速(<15 min)，廉价，较凝集试验更容易判读	检测异嗜性抗体；IM发病1年后可阳性；不是特异针对EB病毒；淋巴瘤、急性HIV或其他病原体感染可呈现阳性结果
EB病毒特异性抗体免疫层析法试纸条或胶板试验	约2种试剂盒	抗原不同	快速(<25 min)	取决于试剂盒，抗原谱可能不完整
酶免疫试验：酶联免疫吸附试验	约15种试剂盒	抗原及抗原制备方法不同	非典型结果需要联用亲和力试验	周转时间为2～3 h，一些生产商针对诊断等的说明图解无临床相关性
酶免疫试验：斑点技术	1种试剂盒		可同时检测巨细胞病毒、刚地弓形虫	周转时间为2～3 h
酶免疫试验：化学发光检测	约2种试剂盒	抗原及抗原制备方法不同	快速(<1 h)；随时可做；有商品化亲和力试验	需要专门仪器

（续　表）

方法	产品数量	试剂盒间的区别	优势	局限性
酶免疫试验：基于流式细胞技术的微球检测	约 3 种试剂盒	可同时检测巨细胞病毒或嗜异性抗体	快速（<1 h）；对特定抗原的反应类似斑点印迹法	需要专门仪器；抗原质量变化较大
酶免疫试验：免疫荧光	3 种试剂盒	包含（抗补体免疫荧光 ACIF）或不含 EBNA	金标准，具有高特异性，可联合亲和力试验	EBNA 的抗补体免疫荧光能同时检测到 EBNA 1 IgG 和 EBNA 2 IgG；只检测 EBNA 1 IgG 时必须联合非免疫荧光方法；费力；周转时间为 2～3 h
酶免疫试验：免疫印迹	约 10 种试剂盒	免疫印迹或线性印迹	线性印迹更容易读取；对非典型结果确认度高；可联合亲和力试验	昂贵，费力；周转时间为 2～3 h
EB 病毒载量：实时 PCR	约 10 种试剂盒	靶基因不同；扩增子长度不同	高度敏感性和特异性	不同试剂盒间可比性不恒定；应参照国际标准品进行校正

目前，一些实验室同时采用多重的基于流式细胞技术（多重流式免疫分析）同时检测针对不同 EB 病毒抗原的抗体。在结果不确定的情况下，亲和力试验可作为这些方法的补充。传统做法是检测针对 3 个抗原复合物的抗体，包括 VCA、EA 和 EBNA。此外，不同的免疫球蛋白同种型（IgG、IgM 或 IgA）也可被检出。大量的检测会产生复杂抗体模式，使结果解释困难。可能的情况下，应该用同一生产商的试剂盒检测同一个患者的不同标志物。疑似单核细胞增多症患者的抗体特征谱见图 103-1。

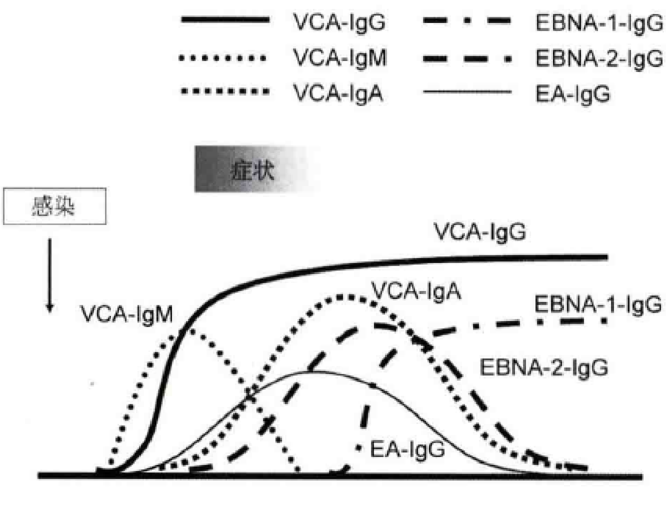


图 103-1　原发感染后针对 EB 病毒抗原产生的抗体的演变。即便不同患者间和实验室间存在抗体滴度的变异，按抗体类别和抗原特异性划分后的相对抗体滴度变化典型模式如图所示

目前，免疫荧光法会同免疫印迹法检测仍是 EB 病毒血清学试验的金标准。不同的免疫荧光检测方法具有相当一致的性能特性（performance characteristics），主要是由于供应商使用相同的细胞；它们的敏感性与酶免疫检测相似甚至低于酶免疫[121]。酶免疫检测和免疫印迹性能更为多变，由于不同试剂盒中使用的抗原种类五花八门，包括从细胞提取物到重组的或融合蛋白及合成肽[121]。这意味着已制定的用于免疫荧光检测结果解释的参照标准不一定适用于所有的酶免疫检测，即使抗原所指的名称相同。例如，EBNA 是通过抗补体免疫荧光方法（anticomplement immunofluorescence，ACIF）在 Raji 细胞中检测到的几个大分子天然蛋白的复合物；在酶免疫检测中，该相同名称可能是指来源于 EBNA 1 的单一寡肽或 EBNA 1 重组蛋白。然而，重组蛋白或多肽比于细胞生长的抗原更易于标准化。

多重流式免疫分析，又称基于流式细胞技术的微粒检测法已经更为普遍，因为这些技术可以平行检测不同的抗原。从理论上来说，此技术能检测多达 100 种独特的可识别荧光标记微球，单个微球上包被有一种不同的抗原[122-125]。类似于印迹法，此方法的优点是可以检测到完整的抗体谱，周转时间需要 1～2 h 和标本随到随做的特点。除 EB 病毒特异抗原，一些检测也包括异嗜性抗体或非 EB 病毒抗原。然而，这类项目检测需要专门的仪器。

此外，运用免疫层析法（即免疫色谱法，如在

试纸条上)检测 EB 病毒的快速检测方法已经问世,实现了单样本快速诊断(5～20 min)。这些方法特别适合于床旁检测。

亲和力试验是检测抗体-抗原结合强度的方法;所有检测方法均可检测亲和力,并不仅限于酶免疫检测。它可以用于区分原发感染(低亲和力)和既往感染(高亲和力)。亲和力的大小以抗体信号衰减百分率计算,是通过尿素对血清进行预处理后与常规检测进行对比得出[119]。这些检测在欧洲要比北美更常用。

VCA 是一种由多种蛋白组成的复合体(如 p18、p23 和 p150),针对这些抗原的抗体不可能同时检测到,用来解释检测试验效能的不同。

抗-EA/D(早期抗原/弥散型,在细胞中弥散分布)及抗-EA/R(早期抗原/局限型,局限于细胞质中)是一类传统上用 Raji 细胞来测定的抗体,做法是先通过佛波酯(磷酸酯)或丁酸钠激发活化 Raji 细胞,使其进入裂解相。乙醇固定可以清除 EA/R 复合物,用乙醇固定的细胞用于 EA/D 抗体的研究。目前已很少将分开的 EA 抗体用于诊断。虽有应用细胞源性的或重组的 EA 蛋白作为抗原来检测抗体,但它常缺乏敏感性和特异性[118,124,126]。由于从特异靶蛋白的角度讲,其具有高度异质性可比性差,EA 检测对于急性 EB 病毒感染的诊断没什么用处。此外,大多数健康献血者存在 EA 抗体,因此,可能给急性 EB 病毒感染诊断带来麻烦而不是帮助[120]。仅在鼻咽癌中 EA 抗体测定确实起到了诊断作用[127]。

同时检测 EBNA 1 和 EBNA 2 抗补体免疫荧光方法已经不再用于常规诊断,因为目前包括细胞源性 EBNA,甚至更好的重组 EBNA 1(p72)的商业化的酶免疫检测已可供选用,其具有极高的敏感性(≥95%)。

在美国,EB 病毒感染的血清学诊断常常通过酶免疫方法检测 2 种、3 种或 4 种标志物的 EB 病毒抗体组合,而较少使用免疫荧光检测。抗体组合包括 VCA IgG 和 VCA IgM,或 VCA IgG、VCA IgM 及 EBNA IgG,或上述最后 3 种抗体与 EA 抗体。如观察到非典型模式(表 103-5),则可选择的复检方法包括复检酶免疫检测,更换其他检测(如免疫荧光检测、免疫印迹法或化学发光检测)方法,或复检 1～2 周后的第 2 份随访血样本等。

表 103-5 应用最常用的抗原和 Ig 同种型得到的典型 EB 病毒血清学概况[a]

疾病状态	抗原,Ig 同种型					
	VCA,IgG	VCA,IgM	VCA,IgA	EA/D,IgG	EA/R,IgG	EBNA,Ig
易感的/无既往接触	−	−	−	−	−	−
原发感染	++	+++	+	+	+/−	−
既往感染	+	−	+/−	−	+/−	+
结果不确定:原发感染或既往感染[b]	+	+	+/−	+/−	+/−	+
结果不确定:原发感染或既往感染[c]	+	−	+/−	+/−	+/−	−
慢性活动性 EB 病毒感染	+++	+	++	++	+	+/−
鼻咽癌	+++	−	+++	+++	+	+++
X 染色体连锁淋巴增生综合征	+/−	−	−	−	−	−

注:[a]+/−抗体缺失或存在;+抗体存在;++滴度抗体升高;+++存在极高滴度抗体。EA/D. early antigen/diffuse; EA/R. early antigen/restricted; EBNA. EBV nuclear antigen; EBV. Epstein-Barr virus; VCA. virus capsid antigens. 非典型模式包括仅 VCA IgM 阳性,仅 EBNA 阳性,或 VCA IgM、EBNA 同时阳性而 VCA IgG 阴性。非典型模式应重复检验,使用随访样本,或更换检测方法。[b]早期检出 EBNA 1 IgG 的原发感染或持续检出 VCA IgM 的既往感染。抗体滴度有助于区分原发感染或既往感染;例如,高滴度 IgM 伴随较低滴度 EBNA 1 IgG 可能提示原发感染,高滴度 EBNA 1 IgG 伴随较低滴度 VCA IgM 可能提示既往感染;对于 2 种感染状态的鉴别还有多种额外方法可供选择(见正文)。[c]VCA IgM 缺失的原发感染或 EBNA 1 IgG 缺失的既往感染。根据初始暴露时间的不同,IM 有症状患者可能无法检出 VCA IgM。随时间推移,一些既往感染患者 EBNA 1 IgG 可消失

在欧洲常用于血清学诊断的一种替代性程序如图 103-2 中所示。在这个高性价比方法中,对血清中 EBNA-1 IgG 特征检测的逐步分析和数据解释是关键起始步骤。这个程序所需时间短和可随到随检(如化学发光检测)的检测方法是可行的。EBNA 1 IgG 抗体正常出现时间在 IM 发生后 6 周～7 个月之间,在急性 IM 中应该为阴性。这些抗体会持续一生,因此是评估既往感染的良好标

志物。然而，5%～10%的患者 EBNA 1 IgG 效价较低甚至无法被检出[128]。年龄增长、严重免疫抑制或风湿性疾病是 EBNA 1 IgG 效价减少或缺失的常见原因。EB 病毒原发感染的诊断不应仅仅依赖 VCA IgM 的检测，因为出现假阳性或假阴性结果的可能性均存在。假阳性主要由于与其他疱疹病毒感染具有交叉反应的类风湿因子和抗核抗体存在引起[129]。假阴性可能由于检测方法的敏感性过低，或样本采集过晚（在 IgM 已经消失后的时期）。

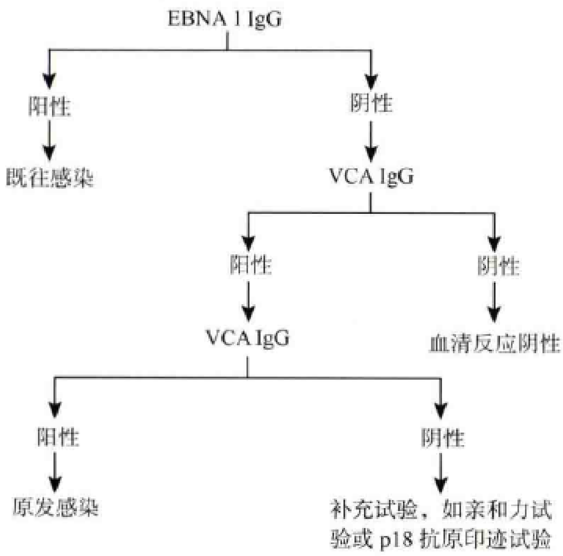


图 103-2 欧洲采用的随到随检的基于 EBNA 1 微球多重检测或快速试验的诊断程序和判读方案。诊断步骤和判读可从 EBNA 1 IgG 开始。如果这一指标阳性，证实存在既往感染；如果 EBNA 1 IgG 为阴性，VCA IgG 同为阴性可诊断为血清学反应阴性，而 VCA IgM 阳性则诊断为原发感染。如 VCA IgG 为阳性而其他指标为阴性，应追加补充试验，例如亲和力试验或 p18 抗原印迹试验

在极少情况下，可以采用 VCA p23、VCA p18 和 EBNA 1 p72 的免疫印迹法[128]。由于 EB 病毒感染后 IgM 类抗体在早期可被检出，而 IgG 抗体产生较晚（类似 EBNA 1 IgG），因此 VCA p18 可能是重要的。采用 p18 的 VCA IgG 可用于替代 EBNA IgG[124] 或作为一项额外的检测。如果 EBNA1 IgG 和 p18 IgG 为阴性，VCA IgG 的亲和力试验可能会提供有用的信息[128]。

对于鼻咽癌而言，针对多种抗原（LMP 2、LMP 1、胸苷激酶、BamHI Z 编码的 EB 病毒复制激活子、EBNA 1 和 Zta）的各种同种型抗体（主要是 IgA，但也包括 IgG）已经被用于疾病诊断的研究。但实际上，结果证明 VCA 和 EA 是临床常规诊断中最重要的检测。

九、结果的评价、解释和报告

（一）传染性单核细胞增多症

抗体检测是诊断免疫功能正常宿主急性 EB 病毒感染的首选方法，核酸检测对这个人群也可能是一个选择，但在这个人群不主张用核酸扩增试验，因在血清学阳性的健康个体中也可能检出 EB 病毒 DNA[85,131-132]。研究提示 EB 病毒 DNA 可从血浆中被快速清除[在（infectious mononucleosis，IM）发生后的 15 天之内][11]，但在全血检测中持续时间显著延长，大多数个体全血病毒 DNA 清除时间在 200 天以内[133]。通过血清学技术检测还含有母传抗体的婴儿（<12 个月）来诊断感染是有问题的，在这种情况下，采用核酸扩增试验检测感染可能有用但需要后续研究[13,85]。

异嗜性抗体是 IM 的标志物，但未必是急性 EB 病毒感染的标志物。在 IM 发生的第一个月可见高滴度异嗜性抗体，正常情况下会快速降低。持续低滴度异嗜性抗体可见于 EB 病毒原发性感染后，最长可达 1 年之久[119]，这种情况具有误导性，更重要的是，异嗜性抗体有时可见于急性 HIV 感染、淋巴瘤或其他病原体引起的感染（如巨细胞病毒、风疹病毒或刚地弓形虫）[134-135]。当异嗜性抗体阳性结果的判读不确定时应当进行 EB 病毒特异性血清学试验。异嗜性抗体假阴性结果出现在幼儿（15%～20%）中已被认同[118,136-137]，但也可出现在青春期少年和成人中，特别是伴有不典型临床表现的个体中。因此怀疑 EB 病毒感染时，在异嗜性抗体检测阴性的情况下应追加 EB 病毒特异性血清学试验。

几乎所有 IM 患者都具有针对多种裂解相 EB 病毒抗原（VCA 与 EA）的高滴度 IgG，但缺乏针对 EBNA 抗原的抗体（图 103-1）。通常对一份血清样本同时检测 VCA IgG、VCA IgM 和 EBNA 1 IgG 可确定患者体内的 EB 病毒状态。抗体谱可足以判断 90%～95%患者：①仍处于 EB 病毒易感状态；②目前处于原发感染；③有过既往感染（表 103-3）。在结果报告中，不主张使用那些试剂生产厂家建议的“新近感染”“感染康复”或“感染

再激活”等术语，因为这些是对健康个体感染状态的描述，其与有症状患者检测结果的报告间缺乏临床相关性。抗体的确切滴度和感染后完整的抗体谱形成所需要的时间在个体中差异很大，且与疾病严重程度没有相关性[133,138]。因此，抗体定量检测在常规诊断中的作用有限。

（二）鼻咽癌

在过去鼻咽癌（nasopharyngeal carcinoma）的血清学试验中，尤其是 VCA IgA 和 EA IgA 的检测曾被作为肿瘤标志物，但是，EB 病毒 DNA 和 EB 病毒微小 RNA（miRNAs）检测明显优于血清学试验，因为病毒载量的变化比抗体的产生和半衰期更快[139-141]。举例来说，肿瘤外科手术后的数小时之内，EB 病毒 DNA 会迅速降低而无法检出[142]。在一项新近开展的筛查研究中，血浆 EB 病毒 DNA（检测下限为 20 拷贝/ml）多次阳性对于诊断鼻咽癌的敏感性为 97.1%，特异性为 98.6%[143]。EB 病毒 DNA 在不同的时间点（治疗前、治疗中、治疗后）及它的清除率起到了肿瘤标志物的作用[144-147]。在鼻咽癌患者的血浆中，EB 病毒 DNA 以非衣壳包裹的游离 DNA 形式存在[148]。此外，鼻咽毛刷 EB 病毒 DNA 载量是明确鼻咽癌诊断的一种重要手段，尤其是在疾病的早期。在最近开展的一项研究中发现，当 DNA 载量临界值取 225 拷贝/ng 时，敏感性为 96%，特异性为 97%[149]。

（三）移植

在移植中，要求确定 EB 病毒的血清状况是为了对风险进行分层。由于被动抗体的存在，幼儿和新近输血患者的血清状况的确定存在一定问题。这些情况下为达到风险分级目的，供者被认定为血清学反应阳性，受者被认定为血清学反应阴性。

高 EB 病毒 DNA 载量状态常常预示 EB 病毒相关 PTLD 症状和体征将于移植后早期出现。移植后常规监测 EB 病毒载量已被推荐用于一些高危患者 PTLD 的预防[66,69]。监测可与预防性干预措施同时开展，包括实体器官移植后降低免疫抑制程度[69]及造血干细胞移植后的利妥昔单抗（抗-CD20）治疗[84]。多个中心已报道应用此方法降低了早期 EB 病毒阳性 PTLD 的发病率[55]。另外，一些中心已经计划对造血干细胞移植受者应用预防性过继免疫治疗方法（使用先前已准备的供体细胞）[69]。然而，在全球范围尚未定义可用于干预触发点的 EB 病毒 DNA 阈值。结合病毒 DNA 水平绝对值，其动态变化在确定患病风险时具有重要意义。

对高危的无症状实体器官移植受者采取连续监测时，应用 EB 病毒 DNA 载量作为诊断试验（也就是指水平高于某特定定量阈值即可诊断 PTLD）对于诊断 EB 病毒检测阳性的 PTLD 具有较好的敏感性，但会遗漏 EB 病毒阴性的 PTLD，以及一些局部 PTLD 病例[68]。但是它的特异性差，从这些群体中得到的阴性预测值较好（>90%），但阳性预测值极差（最低至 28%，最高不超过 65%）。国际指南推荐对于高危群体在实体器官移植后第一年及造血干细胞移植后前 6 个月进行监测[69,84]。目前建议对移植后原发性 EBV 感染患者筛查的间隔可长达 2～3 年[69]，并且不推荐对 PTLD 低危人群或已度过 PTLD 高危风险期的人群进行常规监测[69,84]。

在移植后 EB 病毒血清学阳性的患者常可检测到 EB 病毒 DNA 血症，因此 EB 病毒定量结果已被提议作为全球通用的免疫抑制标志物，可在这些患者中指导免疫抑制治疗[150-153]。但最近的研究发现对细环病毒（torque teno virus）进行载量测定也可达到同样目的，并具有适用于几乎所有患者的优点，不局限于 EB 病毒阳性的患者[154-156]。

如果缺乏近期或过去的监测史，那么出现症状和体征（常为肿物病变）患者的单次的 EB 病毒 DNA 载量结果常常难以解读。

关于应用外周血 EB 病毒核酸扩增试验去监测对 PTLD 的治疗效果及预测疾病复发的相关数据不足。已经在 PTLD 患者及接受抢先治疗的高病毒载量患者中观察到 EB 病毒 DNA 的短暂下降和清除，这与降低免疫抑制程度[157]和过继免疫治疗[76]等临床干预引起的疾病临床和组织学转归同时发生。相反地，使用利妥昔单抗治疗后，血细胞中 EB 病毒 DNA 水平会急剧下降且维持在较低水平，甚至当疾病进展和复发时也是如此[158-159]。在儿科实体器官移植患者，特别是正处于原发感染的患者，可频繁出现无症状的间歇性或持续性 EB 病毒 DNA 反弹，但短期内并无任何影响[157]。目前已观察到 PTLD 成年患者在持续携带低载量病毒的情况下出现病情的复发[158]。

(四)慢性活动性EB病毒感染

已对慢性活动性EB病毒感染患者的血浆和外周血单核细胞样本的病毒载量进行测定，并已使用国际标准作为参考建立了临界值。在外周血单核细胞样本中，与既往感染患者的检测值相比较，病毒DNA临界值取$10^{2.0}$ U/μg时具有极高的敏感性和特异性(分别为99.0%和97.4%)。然而，该检测值与IM患者比较时，临界值增加至$10^{3.2}$ U/μg，敏感性和特异性分别下降至81.6%和86.5%[81]。

(五)脑脊液中的EB病毒DNA载量

基于中枢神经系统淋巴瘤患者脑脊液中EB病毒DNA载量要明显高于外周血或仅可在患者脑脊液中检出这一事实[160]，中枢神经系统病毒载量检测常用于辅助诊断中枢神经系统淋巴瘤，特别是在免疫缺陷患者中。尽管如此，中枢神经系统淋巴瘤的脑脊液EB病毒DNA检测因其缺乏特异性，所以阳性预测值较差。脑脊液中EB病毒DNA的阳性率和定量检测水平在非EB病毒相关疾病中也相当高[160-163]。通过同时定量检测脑脊液和血液的EB病毒DNA水平可能提高诊断的特异性[160,162-163]。组织诊断仍然是诊断中枢神经系统淋巴瘤的金标准，可通过活检组织免疫组织化学或原位杂交方法证实EB病毒存在。

EB病毒感染患者，当其具有原发性免疫缺陷背景，如X染色体连锁淋巴增生综合征，通常具有高EB病毒DNA载量，但不产生EBNA抗体。此类疾病的确诊需要进行遗传学研究来检测其特定的相关遗传变异[48]。

(六)重症患者的EB病毒载量

在多种疾病中，高EB病毒DNA载量被认为是一种附带现象，同时也可在免疫正常的危重患者中观察到此现象。但是，EB病毒DNA载量似乎对于疾病预后不产生不利影响[164]。此外，EB病毒DNA在支气管肺泡灌洗液的检出率相当高，且这部分人群并不患有潜在的EB病毒相关疾病，因此对该类样本检测EB病毒的可用性存在质疑[165]。

十、展望

辅助性实验室检查可提升以高病毒载量预测PTLD的特异性。研究最深入并且最有前景的检测方法是EB病毒特异性的T细胞免疫反应的测定试验。目前已有多种方法可进行该项目检测，如胞内细胞因子染色、酶联免疫斑点法和多肽-主要组织相容性复合物多聚体染色[166-169]。尽管这些检测试验在日常实验室工作中并未广泛应用，但有数据表明在EB病毒特异性T细胞反应的背景下来分析，可显著地改进EB病毒DNA载量预测PTLD的特异性和阳性预测值。尤其是病毒特异性的$CD4^+$和$CD8^+$ T细胞反应似乎有希望成为移植受者PTLD进展的预测标志物[166-169]。

一项有关最新EB病毒诊断的特别有趣的资料是关于对宿主和病毒小RNA(microRNAs，miRNAs)的研究，这是一类非编码的miRNA，其通过抑制蛋白质翻译或降解信使RNA(mRNA)而参与基因调控[170]。不同的EB病毒相关疾病似乎具有特异的miRNA谱。对血液系统恶性肿瘤miRNAs的研究尤其具有开创性。数项研究已证实miRNAs在B细胞分化和淋巴瘤发生中具有重要作用，并对临床结局有预测作用[170-171]。EB病毒本身的2个基因簇BHRF 1和BART(BamHI A右向转录物)编码44个成熟的miRNAs，且病毒与人类miRNAs在宿主的基因调控中相互作用[172-175]。研究miRNAs的一个优势在于它们分子量小且分子稳定，可以在出于诊断目的福尔马林固定的石蜡包埋组织中进行研究，也已经在血浆样本中检出[176]，人类和EB病毒miRNA表达谱正在一些EB病毒相关恶性肿瘤中被广泛研究，用于明确其发病机制，寻求新的治疗靶点，裁定治疗方案及研究作为预后判断的标志物[144,146,172-173,177-179]。

参考文献请扫二维码查阅

第 104 章　人类疱疹病毒6A、6B、7型*

ALEXANDER L. GRENINGER, RUTH HALL SEDLAK, KEITH R. JEROME

（杨天赐、林勇　译；戴二黑、钱渊　审校）

一、人类疱疹病毒 6

（一）分类学

人类疱疹病毒（human herpesvirus，HHV）-6A、HHV-6B 和 HHV-7 是共同组成玫瑰疹病毒属（Roseolovirus genus）的 3 个截然不同的病毒种（virus species）[1]。虽然 HHV-6A 和 HHV-6B 一开始被认为是同种病毒的不同亚型，但已在 2012 年被正式划分为不同种的病毒[2]。上述 3 种病毒与巨细胞病毒（CMV，在其他章节讨论）共同组成 β 疱疹病毒亚科的玫瑰疹病毒属。玫瑰疹病毒属的病毒在基因组结构和遗传组分具有许多共同点，具备在淋巴细胞内复制并建立潜伏感染的能力，与幼儿发热出疹和各种神经系统疾病相关，也具备作为机会致病原感染免疫功能低下患者的能力。在实验室条件下，HHV-6A 和 HHV-6B 具有互相重组的能力[3]。为了方便起见，当两者在某一方面无差异时，通常把 HHV-6A 和 HHV-6B 统称为 HHV-6。

（二）病原体描述

HHV-6 病毒颗粒直径约为 200 nm，由 4 种主要成分组成：一条双链 DNA 基因组（160～170 kb）包含在一个二十面体衣壳核中，核衣壳外有蛋白质表膜，再外面是一个含有各种各样的病毒蛋白和细胞蛋白双层脂质包膜。HHV-6 基因组携带近 100 个独特基因。HHV-6A 和 HHV-6B 两者之间具有 95％的核苷酸序列一致性，是目前发现的人类疱疹病毒两个种之间最相近的。相较之下，HHV-6A 和 HHV-6B 与 HHV-7 在可比对区域的核苷酸相似度仅为 60％，而与巨细胞病毒（CMV）几乎无可比对区域（管家基因的核苷酸一致性＜45％）。

一项最近开展的关于 HHV-6B 基因组的研究显示：活跃地复制的（译者注：代表急性感染）HHV-6B 病毒株的基因簇的聚集与地理位置有关，且相互之间高度相近，平均配对核苷酸一致性＞99.9％[4]。与之相比较，急性感染的 HHV-6A 病毒株的基因组序列的资料很少，虽然现有的数据亦提示配对序列比对显示其与 HHV-6B 同样具有按照地理位置呈现的保守性。

（三）流行病学及传播

1. 流行病学　HHV-6A 和 HHV-6B 两者合并的血清流行率高（＞90％）[5]，但如后面即将要讨论的，两者之间由于具有高度血清交叉反应，使得大规模的分别评估 2 种病毒的血清流行率变得十分困难。该病毒的传播途径主要是通过唾液[6]。大多数人在 2～3 岁时均已被感染过[7]。在美国、日本，以及欧洲国家，HHV-6B 通常在幼年时感染，并且几乎感染所有个体，而这些地区 HHV-6A 在成年人的感染率才达到 50％。在赞比亚，超过 85％的无症状婴儿都检测到了 HHV-6A，这表明 HHV-6 变异株的流行病学在不同国家具有很大差异[8]。但是在乌干达，大约 90％感染 HHV6 的婴儿均为 HHV-6B[9]。需要开展更多研究去全面了解地域差异。

---

*本章包含 Philip E. Pellett 和 Graham Tipples 在本手册第 11 版第 102 章中呈现的部分内容

2. 组织分布　HHV-6A的细胞表面受体是CD46，而HHV-6B的细胞表面受体是分别CD134[10]。有鉴于此，虽然两者的差异性检测受流行率影响，但两者的组织分布具有显著不同。HHV-6B DNA在外周血单核细胞（PBMC）中的检出率可达90%，脑组织中>80%，扁桃体（扁桃体隐窝上皮细胞）中>90%，唾液和鼻分泌物标本中为40%～90%，而在皮肤、肺、心内膜活检标本、大肠的杯状细胞和组织细胞、子宫颈液体和眼房水中检测到HHV-6B DNA的频率低一些。在移植患者的胃肠道也常能检出HHV-6B[11]。受体的亲嗜性可能与HHV-6病毒再激活的移植患者中的T细胞重构延迟有关[12]。在美国的幼儿原发感染期间，通过PCR技术检测发现约2.5%的PBMC标本和17%的脑脊液（cerebrospinal fluid，CSF）标本中均检出HHV-6A，而在99%的PBMC和86%的脑脊液标本中检出HHV-6B[13]。唾液HHV-6A病毒载量中位数水平可从感染后第1周的10^3拷贝/ml增加到第8周的10^5拷贝/ml[7]。排毒可能持续到成年时期，且水平相当高[14-15]。一半以上的肺组织中可检测到HHV-6A DNA，大部分还同时检测到HHV-6BDNA[16]。在对连续收集的40个成人脑组织尸检标本的研究中，HHV-6A的阳性率为28%，HHV-6B为75%[17]；在骨髓移植患者的血浆中HHV-6A和HHV-6B均可检出，而PBMC样本中检出的绝大多数是HHV-6B[18-19]。

3. 潜伏、持续和传播　除了在玫瑰疹的急性期，通过培养很难分离到HHV-6，但采用PCR技术可以从90%儿童的PBMC样本中检测到HHV-6 DNA，在无症状的儿童中偶尔可检出病毒的转录子（约1%的标本）[20]，这提示潜伏感染在PBMC中确实存在。在单核细胞及它们的$CD34^+$骨髓祖细胞和PBMC来源树突细胞中已经检测到潜伏的HHV-6[21]。与其他人类疱疹病毒不同，HHB-6A和6B通常通过整合到宿主细胞的亚端粒区域（subtelomeric regions）而潜伏而不是附加体[22]。虽然在体外试验可观察到HHV-6A在少突胶质细胞中潜伏，目前对其细胞亲嗜性知之甚少[23]。在相当高比例的唾液腺中可检测到HHV-6B和HHV-7，提示该部位是病毒持续感染和排毒的重要场所[24-25]。HHV-6原发感染一般发生在母亲抗体水平降低后，唾液很可能是主要的传播途径[6]。未在母乳中检测到HHV-6，提示母乳不是主要的传播途径[26]。有关HHV-6A传播的还知之甚少。

在人类疱疹病毒中，HHV-6的独特之处在于有大约1.0%的人口在染色体的端粒携带有先天遗传的染色体整合的HHV-6基因组（inherited chromosomally integrated HHV-6，iciHHV-6）。这是由生殖细胞进行垂直传播，因此在这些个体的所有细胞均具有病毒DNA[22,27]。iciHHV-6可导致脑脊液和血液中持续存在高水平的HHV-6 DNA，这一现象通常在移植后患者中观察到[28]。虽然目前并不清楚iciHHV-6再激活有多频繁，但最近的研究表明该事件是可能发生的[29-30]，且能够解释某些先天感染的病例[31-32]。虽然某些iciHHV-6B病毒株与急性感染的HHV-6B病毒株具有一定的基因相似性，许多不相关的iciHHV-6病例具有相同的iciHHV-6序列，提示在HHV-6的遗传上具有奠基者效应[4,33]。

（四）临床意义

虽然HHV-6感染在免疫功能正常的个体一般为亚临床或出现轻微临床表现，但在免疫功能不全者可表现为重症。

1. 原发感染　HHV-6原发感染表现为玫瑰疹（也称为婴儿玫瑰疹、第六病和幼儿急疹），占6～12个月婴儿因发热到急诊就诊病例的10%～20%[34]。虽然玫瑰疹的主要病原体是HHV-6B，但已有少数HHV-6A引发玫瑰疹或发热性疾病的报道。大约94%的儿童在原发感染时会出现临床症状，其特异性的相关症状包括发热（58%）、哭闹（70%）、流鼻涕（66%）、腹泻（26%）、皮疹（31%）和玫瑰疹（24%）[7]。

玫瑰疹的典型症状包括体温突然升高（39～40℃），可持续3～5天。发热减轻的同时出现斑丘疹（图104-1），通常在3天内消退。皮疹首先出现在颈部、耳后和背部，随后可波及身体其他部位。病程2～7天，一般没有后遗症。出疹前可能出现的临床症状还包括淋巴结肿大、鼓膜发红、悬雍垂和软腭接合处丘疹（永山斑）。

HHV-6原发感染也可表现为发热不出疹或出疹不发热，因为约有3/4的病例不符合玫瑰疹的临床定义。不常见却比较严重的HHV-6原发感染症状可包括40℃以上高热、呼吸道窘迫、腹泻和惊厥。尽管HHV-6原发感染时发生惊厥较为

罕见，但这类感染在高热惊厥的儿童中占比例较大[35-36]。近来的研究表明 HHV-6、高热惊厥及内侧颞叶癫痫之间存在关联[37-38]。其他已报道的 HHV-6 原发感染后严重但罕有的并发症包括：肝脾肿大、Gianatti 综合征（贾纳蒂综合征，一种与乙肝病毒和 EB 病毒感染有关的儿童期的肢端皮炎）、囟门膨出、无菌性脑膜炎、脑炎（约占脑膜炎和脑炎病例的 1%）[35]、先天性感染引起的严重神经系统症状，以及播散性致死感染。

成人原发感染较罕见，但可能很严重。临床症状包括单核细胞增多样症样的疾病、迁延不愈的淋巴结疾病和暴发性肝炎。



图 104-1 HHV-6B 原发感染儿童的玫瑰疹（由 M. Davis 提供的公共领域图片），见彩插

2. 移植受者和免疫抑制人群 在免疫抑制的条件下，HHV-6 通常出现再激活。比如，在艾滋病患者中可出现 HHV-6 的再激活并导致播散性感染[39]。临床上最常见的 HHV-6 再激活出现在移植后。大部分的病例是由 HHV-6B 引起，不足 3% 的患者感染 HHV-6A。与之相反的是，30%～50% 的移植受者的血清或血浆中可检出 HHV-6B[40-42]。病毒的再激活通常在移植后的 2～4 周出现。据报道，HHV-6 再激活时间的中位数是 20 天，HHV-7 为 27 天，巨细胞病毒为 36 天[5]。

有多种疾病临床表现与移植受者的 HHV-6 再激活相关。在这些表现中，脑炎是记录最为详尽的。HHV-6 相关脑炎在造血细胞移植者的发生率约为 1%，其可导致边缘系统、脑干及海马体的损伤，具体表现为癫痫、认知障碍及异常脑电图。HHV-6 发生脑炎的发生率与移植类型有关。在脐带血移植受者中发生率约为 10%[42]，而在实体器官移植受者中发生的概率则小得多[41,43]。有意思的是，脑脊液中 HHV-6 DNA 的水平在再激活时比原发性感染更高[44]。另外，HHV-6 对中枢神经系统具有一定的影响，但比脑炎轻得多，其影响包括造血细胞移植后谵妄和认知功能下降[45]。

移植后 HHV-6 的再激活还和其他临床表现有关。骨髓抑制和植入延迟均已有报道[46-47]。数项研究表明 HHV-6 与急性移植物抗宿主疾病的发生相关[40,46,48-49]。有意思的是，一项研究提示：HHV-6 的再激活与急性移植物抗宿主病可诱发对方的进一步发展[50]，将来应当开展研究以阐明两者之间的关系及机制。HHV-6 可能导致同种移植物功能障碍和排斥。在一项关于肝移植的研究中，某些患有移植物肝炎的患者经过抗病毒治疗收到良好疗效[51]。除了同种移植之外，还有报道提示在造血细胞移植的情况下 HHV-6 可影响其他器官，包括肝[52]和肺[53]。在肺泡灌洗液中检出 HHV-6 与特发性肺炎综合征的发生有关[53]。最后，HHV-6 还和造血细胞移植[40,54]和实体器官移植患者[55-56]巨细胞病毒再激活的风险增加有关。在重症监护室收治的患者中，巨细胞病毒和 HHV-6 同时再激活所导致的后果比其中任意一种病毒单独再激活要轻[57]。与之相同的是，一些研究提示 HHV-6 的再激活预示着造血细胞移植后死亡风险增高[40,46,58]。这些关联到底是提示两者之间存在因果关系，还是仅仅反映了潜在的免疫抑制仍有待于确定。尽管有这些关联的存在，一个随机临床试验的结果表明，对肝移植后的患者开展 HHV-6 常规监测其临床意义不大。

iciHHV-6 可影响免疫抑制人群的临床结局，但需要开展更多的研究[60-61]。已经显示在受体或

供体具有 iciHHV-6 的情况下，2～4 级急性移植物抗宿主疾病的发生率更高。受者若具有 iciHHV-6，则 CMV 病毒血症的发生率也随之增高。

3. 其他

(1)药物诱发的超敏反应综合征(drug-induced hypersensitivity syndromes，DIHS)：使用某些药物偶尔可导致严重的、有时甚至是致命的各种反应，称为 DIHS，药物疹伴有嗜酸性粒细胞增多症、全身性反应性药疹和抗惊厥药超敏反应综合征[63]。HHV-6 的再激活在药物疹伴有嗜酸性粒细胞增多症、全身性反应性药疹病例中被特异性检测到，但未在中毒性表皮坏死分解症或 Stevens-Johnson 综合征的患者中检测到。HHV-6 究竟可以诱发或使这些症状恶化，还是仅作为免疫激活的一种生物标志物，目前仍存疑问。

(2)桥本甲状腺炎(Hashimoto's thyroiditis，HT)：HT 是一种自身免疫状态，在这种状态下甲状腺缓慢被破坏。该疾病在女性中更为常见，被认为是遗传因素和环境因素共同作用的结果。有 2 项研究报道，HT 患者或自身免疫性甲状腺病的甲状腺针吸活检标本或甲状腺组织中的 HHV-6 检出率和病毒载量高于对照组[66-67]。通过免疫组化发现，HT 患者的甲状腺组织存在 HHV-6 抗原表达。同时与对照组相比，HT 患者的自然杀伤细胞(NK 细胞)的活性和 T 细胞对感染 HHV-6 的甲状腺细胞的应答均增强，提示 HHV-6 可能在 HT 的发病中具有作用。

(3)心肌病与心血管病：在急性和慢性心肌病患者的受损心脏组织中能够检测出 HHV-6B 抗原和病毒 DNA[68-69]。一项纳入 19 597 例研究对象的研究揭示 iciHHV-6 总阳性率为 0.58%，在 iciHHV-6 阳性人群中，心绞痛的患病率是非 iciHHV-6 阳性人群的 3.3 倍，但未发现其与心肌梗死的关联[70]。

4. 其他疾病　没有明确的证据证明 HHV-6 与多发性硬化、恶性肿瘤或慢性疲劳综合征有因果关系。一项基于人口的病例对照研究，纳入加拿大的不列颠哥伦比亚省和安大略省 1090 例新发乳腺癌女性患者和 1053 名对照，未发现 iciHHV-6 与女性乳腺癌之间有显著性的统计学关联(比值比为 0.87)。HHV-6 已经被认为是军事训练中生理性疲劳的一个生物标志物，但与慢性疲劳综合征或其他病理性疲劳没有关联[71]。对于上述的多种关联，必须采用有效的抗病毒药物随机临床对照试验来证实[72]。

5. 治疗　对 HHV-6 的抗病毒治疗已经进行了深入探讨[2]。目前尚无批准用于 HHV-6 治疗的抗病毒药物，但类似于人巨细胞病毒的治疗方案已经在使用，包括更昔洛韦、西多福韦和膦甲酸钠，因为上述药物在体外具有抗 HHV-6 活性。青蒿琥酯(artesunate，二氢青蒿素-12-a-丁二酸单酯，抗疟药)在体外具有抗 HHV-6 活性，已有青蒿琥酯有效治疗 1 例 HHV-6B 相关心肌炎患者的个案报道[68]。少数几项截止到现在已经完成了的临床试验，并未发现对 HHV-6 进行抗病毒治疗能显著改善其预后[73-75]。尽管如此，在免疫受损的患者 HHV-6 再激活的情况下，使用抗病毒药物治疗是合适的[76]。在考虑对 HHV-6 阳性患者进行抗病毒治疗时，区分 iciHHV-6 和 HHV-6 再激活十分重要，在做抗病毒治疗的决定时临床表现应该占有很重的分量[27]。事实上，检测 iciHHV-6 常用于支持停止给予 HHV-6 PCR 阳性但无明显临床症状的患者抗病毒治疗。尽管如此，必须认识到 HHV-6 再激活和相关疾病在 iciHHV-6 患者中也可发生，因此如果临床表现与 HHV-6 疾病相符，iciHHV-6 的存在并不足以支持停止治疗。

(五)标本的采集、运输和存储

可以采集唾液标本用于各种方法的病毒检测，包括滤纸条[77]、口腔拭子、咽拭子和吐出的唾液。采集血液标本后应尽快将血浆从血细胞中分离，以避免带有 iciHHV-6 的个体由于细胞 DNA 的释出而出现假阳性结果。打算用于 PCR 检测的血清、血浆、脑脊液、肺泡灌洗液、组织和细胞可以冷冻运输。有研究表明单次冻融可导致 HHV-6 定量检测出现 10 倍下降[14]。采用 FilmArray 脑膜炎/脑炎组合(BioFire/梅里埃生物，盐湖城，犹他州)的脑脊液标本可在室温最多放置 1 天，或者在冷藏条件下放置 7 天。全血是用于微滴数字 PCR 检测 iciHHV-6 的首选标本[78]。

(六)直接检测

HHV-6 的直接检测可以采用免疫组化法[79-80]、原位杂交法和原位 PCR[81-82]。最常见的直接检测方法是 PCR 技术。PCR 的敏感性对于检测 HHV-6 有特别的意义，因为即使在病毒活动

期，病毒DNA浓度也相对较低。已有研究文献报道利用多个HHV-6的基因组靶点建立多种PCR的检测方法，在某些情况下也包括多重PCR方法[83-84]。如果选用的PCR引物和探针得当，PCR可以非常容易地区分HHV-6A和HHV-6B。检测HHV-6 mRNA的逆转录PCR对于特异性地检测HHV-6病毒的活跃复制十分有用，且可能可用于区分病毒的潜伏和再激活状态[85]，这在iciHHV-6的患者中尤其重要。

定量PCR(用全血或PBMC)非常适用于确定移植患者的病毒载量基线水平，测定结果显著高于基线则提示活动性感染和出现临床症状的疾病风险增高。PCR可采用血浆、血清、全血和PBMC。作者建议使用血浆进行PCR检测HHV-6，在血浆或血清检出HHV-6 DNA与活动性病毒复制指标密切相关[86]；相反，如果在其他类型的标本中检出HHV-6可能来源于潜伏感染细胞或是从中释放的DNA。

如同所有的定量实时PCR，检测HHV-6时应包含一个同时扩增的阳性内对照，最理想的是能够鉴别出2个不同种的HHV-6。需要精确标准化和纳入敏感性计算、结果判读的重要变量是最初裂解后制备模板的材料的量(如液体的体积或细胞的个数)和这种材料在每个反应混合物中的量[87-88]。

精选出来的开展HHV-6检测的参比实验室见表104-1。对HHV-6 PCR试验进行全面评估至关重要[83]，正如为了提高定量测定的标准化应该不断进行比对和能力验证[89]。不同实验室之间的HHV-6病毒载量PCR测定一致性较差[89-90]。为了解决这一问题，世界卫生组织最近建立了用于HHV-6的临时国际标准品，它包含HHV-6B的Z29毒株和HHV-6A的GS毒株。这2个病毒株和JC、BK多瘤病毒[3,91-93]一样，在复制起始点具有较长的重复序列且具有高水平基因组重新排列的可能性，因此，在开展诊断性PCR试验时应避开这些区域。近期一种FDA认可的检测脑膜炎/脑炎的多重PCR试剂盒将HHV-6纳入检测体系，随着更多的实验室开展HHV-6检测，HHV-6在脑炎中的检出很可能会增加(表104-2)[94]。

表104-1 入选的可提供HHV-6和HHV-7检测的参比实验室

实验室	网址	HHV-6	HHV-6	iciHHV-6	HHV-7	HHV-7
		PCR	血清学		PCR	血清学
ARUP Laboratories	www.aruplab.com	qPCR(血清、血浆、脑脊液)	IgM、IgG			
Coppe Labs	http://www.coppelabs.com/	qPCR、逆转录PCR(血浆、全血、脑脊液、骨髓、组织)	IgM、IgG	PCR(毛囊、指甲)		
LabCorp	www.labcorp.com	PCR、qPCR(血清、血浆、全血、脑脊液)	IgM、IgG			
Mayo Medical Labs	www.mayomedicallaboratories.com	PCR、qPCR(血清、血浆、全血、脑脊液、肺泡灌洗液、骨髓)				
Quest Diagnostics	www.questdiagnostics.com	qPCR(血清、血浆、全血、脑脊液、肺泡灌洗液、尿)	IgM、IgG		qPCR(血清、血浆、全血)	IgM、IgG
University of Washington	www.depts.washington.edu/uwviro	qPCR(血清、血浆、全血、脑脊液、肺泡灌洗液、骨髓、组织)		ddPCR(全血)		
Viracor	www.viracor-eurofins.com	PCR、qPCR(血清、血浆、全血、脑脊液、肺泡灌洗液、骨髓、尿、粪便、组织)	IgM、IgG			PCR、qPCR(血清、血浆、全血、脑脊液、肺泡灌洗液、骨髓、尿、粪便、组织)

注：ddPCR.微滴数字PCR

表 104-2　经美国 FDA 准许的和欧盟 CE-IVD 标注的 HHV-6 检测方法

监管状态	检测名称	制造商	检测限	靶基因	敏感性	特异性
美国 FDA 准许	FilmArray Meningitis/Encephalitis panel	BioFire/bioMérieux	10 000 拷贝/ml	未知	85.7%	99.7%
欧盟 CE-IVD 标注	HHV-6 ELITe MGB kit	ELITechGroup	132 拷贝/ml	ORF13R,U67	100%	100%
	RealStar HHV-6 PCR kit	Altona	50 拷贝/ml	未知	100%	100%
	artus HHV-6 RG PCR kit	Qiagen	2 拷贝/μl DNA 提取物	未知	100%	100%
	Herpes virus type 6 (HHV6) PCR Kit CE/IVD	Emelca	5 拷贝/μl DNA 提取物	U67		
	Human herpes virus 6/7 (HHV-6/7) PCR kit	GeneProof	500 拷贝/ml	U57		
	CMV HHV6,7,8 R-Gene	bioMérieux	555 拷贝/ml 全血	U57	100%	96.40%
	RealLine HHV-6	Bioron	100 拷贝/样本	U72	100%	100%

数字 PCR 定量检测对于 HHV-6 检测极富吸引力，因为该技术能够精确计算人类和病毒 DNA 的拷贝数。在数字 PCR 检测过程中，一个样本被分为数千个部分，每个部分均进行 PCR 扩增直到反应终点。阳性扩增部分的比例可用于计算待测标本初始浓度。与传统定量 PCR 来比，数字 PCR 的准度和精度都更好。数字 PCR 的准确度也为上述定量实验的可比性差的问题提供了解决方案。

(七)分离程序

通过与经刺激的人脐带血淋巴细胞共同培养，从患者 PBMC 中可以分离出 HHV-6[95-97]。但病毒分离培养不用于常规临床诊断。

(八)鉴定

通过电子显微镜观察，HHV-6 病毒颗粒具有典型的疱疹病毒形态学特征，即病毒体呈球形，直径约 200 nm，有包膜。核衣壳为 90～110 nm 的二十面体，内部是高电子密度的核，外部由无定型的壳包裹[1]。有许多针对 HHV-6A 和(或)HHV-6B 的单克隆抗体(包括商品化的和来自研究性实验室的)可以获得[98]。

(九)分型系统

应用种特异性单克隆抗体和种特异性 PCR 试验可对 HHV-6A 和 HHV-6B 进行分型。在许多情况下，区分 HHV-6A 和 HHV-6B 对于患者管理和治疗并不是必需的，但能够区分 HHV-6A 和 HHV-6B 的实验在共感染或 iciHHV-6[99] 存在的情况下是有用的，这可以更好地了解这些病毒感染的临床表现。分型系统通常是基于 HHV-6A 和 HHV-6B 均高度保守的引物结合区，以及可用针对一种或另一种病毒的特异性探针进行测定的中间区域。近来 GenBank 上已有扩展后的 HHV-6 全基因组序列，可利用此序列设计其他方式的 PCR 试验。

(十)血清学试验

目前检测 HHV-6 抗体的血清学方法有很多种，并且有商品化试剂。这些血清学方法仅限于对原发感染的诊断有用，但不能识别 HHV-6 的再激活。通过采用基于免疫荧光技术的抗体亲和力测定可以鉴别现症感染还是既往感染，但是还没能应用于临床[100]。HHV-6 原发感染后，从低亲和力抗体到高亲和力抗体的转变大约需要 5 个月。抗体亲和力试验也可以用于区分 HHV-6 和 HHV-7 的原发感染。通常在原发感染出现发热后的 3～8 天可以检测到中和抗体。

由于具有蛋白序列同源性，HHV-6A 和 HHV-6B 之间存在极强的交叉反应性，且与 HHV-7 和 CMV 之间也有一定的交叉反应性[100-101]。在一些患者体内，HHV-6 和 HCMV 2 种抗体同时升高，可能是因为这 2 种病毒的同时活动并对交叉反应抗原产生应答。据文献报道，有一种试验能对 HHV-6A 与 HHV-6B 2 种抗体进行鉴别[102]，但该试验并未被广泛应用。尽管 HHV-6 和 HHV-7 之间抗体应答有时存在交叉

反应，吸附试验和抗体亲和力试验可以对这2种抗体进行区分[100]。

(十一)抗病毒药物敏感性

磷甲酸钠(foscarnet)、西多福韦(cidofovir)和更昔洛韦(ganciclovir)具有极高的体外抗病毒活性和选择性。与人CMV相似，编码蛋白激酶HHV-6 U69或HHV-6 DNA聚合酶基因(U38)突变会导致HHV-6对这些药物耐药[103-104]。目前还未有可用于临床的HHV-6抗病毒药物敏感性试验，但已有一项基于PCR的快速基因分型实验可检测U69-相关突变，用于评估更昔洛韦的耐药[105]。在移植术后的患者中HHV-6对更昔洛韦的耐药已有报道，但这种情况非常少见[106]。

(十二)结果的评价、解释和报告

临床表现多变、病毒具有建立潜伏感染和再激活的能力，以及iciHHV-6的存在，使得HHV-6感染的诊断变得十分复杂。有鉴于此，临床医生需要开哪种实验室检测和检测结果的判读极度依赖临床表现。

HHV-6最常见的表现是在幼年儿童中的原发性感染。如本章前面所描述，感染的表现通常较为典型。幼儿急疹(玫瑰疹)在视觉上突发、给人印象深刻，但相比较之下，全身性的症状和发热则较为温和。虽然玫瑰疹病毒属的原发性感染导致医疗资源消耗显著上升[7]，但对某些较为简单病例的临床诊断，即便不采用实验室确诊实验也已足够。但从另一方面讲，在上述情况下利用实验室确诊实验可带来其他益处，如减少不必要的住院或过度使用抗菌药物。在一些比较严重的病例中，约有1/3的发热性癫痫持续状态可归因于玫瑰疹病毒属感染[36]，因此在这种情况下纳入HHV-6的诊断鉴别实验是必需的，包括脑脊液和血浆标本的PCR实验。

临床上HHV-6检测最经常用于患者出现免疫抑制的情况，尤其是造血细胞或者实体器官移植。HHV-6可与多种终末器官并发症同时出现，但其中最为常见的是中枢神经系统改变。HHV-6实验室诊断的支柱是PCR检测。虽然目前还没有FDA认可的定量实验用于检测HHV-6，但已经有多种经过参比实验室和其他实验室(表104-1和表104-2)验证的HHV-6 DNA载量实验可用。应当认识到不同实验室之间的HHV-6 PCR定量实验一致性极差，因此，目前没有广泛认可的定量阈值用于治疗，临床医生必须避免采用不同实验室的结果进行病毒载量比较。但这个情况可能因为WHO国际标准品的应用而改善，虽然根据先前使用CMV国际标准品的经验来看，这并不能完全解决不同实验室之间的不一致[107]。

对于大部分临床表现，本文作者推荐采用PCR检测血浆或血清，和另一种根据临床表现选择的标本种类(脑脊液、肺泡灌洗液或组织)一起做。大部分的实验室都将上述样本中检出病毒作为HHV-6是病原的提示。但是，随着实验标准化的改进，将来PCR实验可以确定病毒载量阈值，更好地指导临床诊疗决策。在血浆中未检出HHV-6不能排除其在特定器官或组织存在局部活动性感染。另一方面，必须要认识到，如果在细胞类型的样本如组织或全血检出低水平HHV-6则更倾向于反映病毒潜伏感染，而不是活动性病毒复制。最后，如果采用PCR检测单种病毒，要认识到HHV-6阳性不能排除其他病毒的共感染。新近开发的简单易行且具有多重检测效能的PCR实验，如包含HHV-6的BioFireFilmArray(bioMérieux)试剂盒，有助于解决这一问题。一如前述，临床表现决定了检测方法的选择和结果的判读。

在iciHHV-6存在的情况下，采用PCR检出HHV-6 DNA尤其难以判读。这种患者的细胞类型样本含有较高水平的HHV-6，但血浆样本检测结果通常也是阳性，这是因为细胞DNA释放(从定义上来说它包含了iciHHV-6患者的病毒DNA)。因此，在血浆中检测出高水平的HHV-6应当排除iciHHV-6的存在，尤其是DNA水平与临床表现不符。以前iciHHV-6检测需要通过对毛囊或指甲进行荧光原位杂交或定量PCR，但数字PCR技术的出现使得iciHHV-6的快速检测成为可能，而且数字PCR的高精度允许对HHV-6和人类参考基因(RPP30)同时进行定量。因为携带iciHHV-6的个体在每个细胞中均带有一个拷贝的HHV-6，因此如果HHV-6与细胞基因组等价物(2个RPP30/细胞)的比率不在1 ± 0.07范围[78]则可排除iciHHV-6携带，除非在非常罕见的情况下某些个体携带有2个或以上的iciHHV-6拷贝，在这些个体中病毒和细胞基因组的比例可

能接近于2.0、3.0或更高。某些专家建议应当在移植患者的临床管理上常规开展iciHHV-6的检测[108]。

虽然iciHHV-6的存在可以解释血浆中的高病毒载量，但必须认识到iciHHV-6携带者仍然可能有与病理过程相关的活动性HHV-6复制的情况。对于有潜在的iciHHV-6A的患者，通过采用多重基因型特异性数字PCR可判断iciHHV-6B的再激活[99]。如出现完全相反的结果，尽管十分罕见，也可能是正确的。对于携带iciHHV-6B的患者来说，不能通过qPCR或数字PCR来诊断活动性复制，因为其具有背景反应性。在这种情况下，通过逆转录实时定量PCR检测病毒RNA转录子有希望区分潜伏感染和活动性感染，虽然该实验还未被广泛应用。

除了PCR及其相近的检测方法，其他用于检测HHV-6的方法在临床治疗上的作用都极其有限。培养被认为是直接检测的“金标准”，但过于浪费人力、耗时较长且敏感性不高，因此不适合于临床应用。血清学试验更适用于基于人群的病毒感染和流行研究。用双份血清检测原发性感染过于缓慢，因此也不适用于临床应用，而IgM检测无法可靠区分原发性感染和再发感染[109]。

二、人类疱疹病毒7

(一)分类学和病原体描述

HHV-7是组成玫瑰疹病毒属的3种病毒(HHV-6A和HHV-6B)之一[1]。上述3种病毒与CMV一起，是β疱疹病毒亚科的4种人类病毒。玫瑰疹病毒属之间具有相近的基因组结构和基因序列，都具有在淋巴细胞内潜伏和复制的能力，能在儿童中引起发热性皮疹及神经症状，以及在免疫抑制患者中是机会感染的病原体。HHV-7病毒颗粒直径约为170 nm，由4种主要成分组成：一条双链DNA基因组(145 kb)，包含在一个二十面体衣壳核中，衣壳被一层蛋白质表膜所包围，上述3种成分之外覆盖着双层脂质包膜，其表面镶嵌着多种病毒蛋白和细胞蛋白。与其他玫瑰疹属病毒相比，HHV-7的基因序列数据较少，但HHV-7基因组携带了约100个独特基因，与HHV-6A、HHV-6B在对位区约有60%的碱基一致性。

(二)流行病学及传播途径

1. 流行病学 与HHV-6相近，HHV-7感染非常常见[110]，且大部分的感染均在儿童时期发生。与HHV-6相比，HHV-7原发性感染的典型年龄(中位数26个月)较晚[111]。

2. 组织分布 虽然HHV-7可以感染其他类型的细胞[112-113]，但其主要感染$CD4^+$淋巴细胞。其主要细胞受体是CD4，最大的可能是与细胞糖蛋白结合[114]。HHV-7抗原在唾液腺腺泡、肺部、皮肤及乳腺中均可检测到，此外肝、肾及扁桃体等器官中也偶尔检测到[115]。通过PCR技术已在外周血单核细胞、唾腺液、胃黏膜、皮肤、子宫颈拭子、支气管肺泡灌洗样本及脑组织[116]都检出了HHV-7 DNA，虽然在某些病例中检出DNA可能只是反映了被感染的$CD4^+$细胞的存在。可以很容易地从健康成年人的唾液中分离出具有感染性的HHV-7。通过PCR技术在未经培养的淋巴细胞中能够检测到HHV-7 DNA，而在没有活化T细胞存在的条件下无法检测到感染性的病毒，表明该病毒能在$CD4^+$细胞中潜伏。新近发表的一项报告提示HHV-7与HHV-6相同，均能与生殖细胞整合，导致iciHHV-7携带[117]。

3. 传播方式 采用PCR常能够从健康成人的唾液中检测到HHV-7。已有研究提示唾液中HHV-7和(或)HHV-6的水平可能代表生理性疲劳而不是病理性疲劳的生物标志物[71]。虽然唾液是最明显可见的传播途径，但在乳汁、尿及子宫颈分泌物中也发现了HHV-7。与HHV-6不同，HHV-7的先天性传播即使有，也是极为罕见的[118]。

(三)临床意义

1. 原发感染 与HHV-6相似，HHV-7同样可引起幼儿急疹(玫瑰疹)，但其引起该疾病的频率较HHV-6低。如上所述，HHV-7原发性感染的典型年龄(中位数26个月)比HHV-6晚[111]。在有症状的原发感染儿童中，发热程度、皮疹或胃肠道症状等方面HHV-6和HHV-7感染之间并无区别，但HHV-7原发性感染儿童发生癫痫的风险比HHV-6感染儿童高[35,111]。

2. 免疫功能受损患者 与所有疱疹病毒相似，HHV-7经原发感染后可建立潜伏状态，并能

在之后再激活，尤其是在免疫功能不全的宿主中。实体器官移植后的再激活概率为0～45%，通常在移植后的第2～4周发生[119]。虽然有散在的病例见诸报道，但从整体来说，目前对于HHV-7相关的有症状疾病并未有详尽记录。一项在肝移植患者中开展的随机临床试验表明HHV-7常规监测不具有临床效益[59]。

3. 其他 在患有间质性肺炎的非免疫功能受损患者肺组织中检测到HHV-7 DNA的概率较大且载量通常较高[120-121]。从肺移植患者采集的肺泡灌洗液、支气管活检标本有20%～50%可检出HHV-7 DNA，但要确定其是否具有病原学意义十分困难，因为通常还可同时检出CMV，且常用抗病毒药物对这2种病毒均具有活性。有研究认为HHV-7和玫瑰糠疹具有关联性，但数据尚无一致定论[123-124]。HHV-7在不同个体的多种组织中均可检出，但临床意义不明。

(四)治疗

总体来说，HHV-7可以被与用于HHV-6和CMV相似的药物所抑制(包括更昔洛韦、磷钾酸钠及西多福韦)[125]，但HHV-7所需的抑制浓度可能更高[126]。目前在临床上还未见关于HHV-7耐药性的报道，但似乎在生物学机制上没有理由说HHV-7耐药性可以不发生。关于HHV-7的治疗方案尚未确定，由于HHV-7感染与疾病的关联性较弱，且经常与其他人类疱疹病毒存在共感染，对药物的敏感性也类似，上述种种使HHV-7的治疗难以确定的现状无限期延长。

(五)标本的采集、运输和存储

关于检测HHV-7的样本处理方法同HHV-6。

(六)直接检测

在电子显微镜下，HHV-7病毒颗粒具有疱疹病毒的典型特征。从某些研究性实验室[127]和美国国立卫生研究院的AIDS试剂计划可获得商品化的单克隆抗体。已有实时荧光定量PCR法检测HHV-7[84,128]，以及多重法检测多种疱疹病毒的[83-84]的报道。表104-1列出了开展HHV-7检测的参比实验室。HHV-7目前还未被纳入BioFireFilmArray脑膜炎/脑炎检测组合。

(七)分离程序

HHV-7可以采用与HHV-6类似的方法来培养。HHV-7分离株最初可在原代细胞培养，或者先前HHV-7适应株(如SB株)可在SupT1细胞中生长。虽然HHV-7原代分离株的培养是可行的，但对于临床诊断并不具有实用价值[95]。

(八)鉴定

上述PCR方法为准确鉴定HHV-7病毒提供了敏感、特异、快速的手段。单克隆抗体对组织IHC检测有帮助，但其在临床诊断中并无作用。

(九)分型系统

尚未鉴定到具有生物学意义的HHV-7亚型。

(十)血清学试验

HHV-7的血清学试验在临床诊疗中并不起主要作用。目前尚无FDA认可的试剂可用。先前报道的HHV-7血清学试验包括中和试验、免疫印迹试验、免疫沉淀反应、免疫荧光检测试验，以及酶联免疫吸附试验(euzyme linked immunosorbent assay，ELISA)(文献[127]对此进行了综述)。经比较，免疫荧光试验、免疫印迹试验和ELISA 3种方法各项性能非常相似，ELISA在敏感性方面略胜一筹，而免疫印迹试验在特异性方面稍占优势[129]。正如上述HHV-6中描述的抗体亲和力试验，可以区分HHV-7原发和再发感染[100]。

(十一)抗病毒药物敏感性

抗病毒药物敏感性试验在HHV-7感染的临床诊疗中不具有意义。如前所述，抑制HHV-7所需的药物浓度可能比其他β疱疹病毒高。

(十二)结果的评价、解释和报告

由于HHV-7感染通常症状较为温和且其与严重的临床疾病关联较弱，因此，特异性检测HHV-7的方法很少被提及。某些大型参比实验室具有采用PCR和血清学试验检测HHV-7的方法。参比实验室和BioFireFilmArray的脑膜炎/脑炎检测组合均未把HHV-7纳入其中。在检测HHV-7的同时常可检出其他病原体，因此，必须

认识到检出HHV-7并不能排除其他病毒或者非病毒病原体的存在，而检测到的许多病原体在疾病发病中具有更明确的病原学作用。

三、发展趋势

HHV-6A、HHV-6B和HHV-7均可导致感染，且需要准确的临床和实验室诊断。但是，对这些实验室检测手段的需求通常局限于特定人群，尤其是免疫抑制人群和儿童。未来应当着重阐明上述病毒在疾病中的作用，以及区分上述病毒的正常携带和病毒引起的疾病发生。随着快速多重PCR检测方法的逐渐普及和HHV-6被纳入某些经过认证的检测组合，期待未来可以检测到的HHV-6显著增多，且能加深关于疾病与玫瑰疹病毒属之间关联的认识。

参考文献请扫二维码查阅

第105章 人类疱疹病毒8型

SHEILA C. DOLLARD, CLIFFORD J. GUNTHEL

(杨天赐、林勇 译;戴二黑、钱渊 审校)

一、分类学

根据核酸序列和生物学特性,人类疱疹病毒8型(HHV-8)被归类为γ型(丙型)疱疹病毒亚科,猴疱疹病毒属(*Rhadinovirus*)。与其最为相近的人类疱疹病毒是EB病毒,也属于γ型疱疹病毒亚科。其他已知的人类疱疹病毒包括单纯疱疹病毒1和2、水痘-带状疱疹病毒、巨细胞病毒、人类疱疹病毒6A、6B和人类疱疹病毒7型。

二、病原体描述

HHV-8基因组是双链DNA,长度约为160 kb,包含超过85个基因,其中某些基因是从宿主衍生的[1-2]。所有的疱疹病毒均由20面体对称的核衣壳和衣壳外的蛋白质表膜组成。核衣壳内包含病毒DNA。HHV-8是最新发现的人类疱疹病毒。在20世纪60年代,通过卡波西肉瘤的穿刺组织培养出病毒样的颗粒[3]。随后研究者分析了从皮损中获得的遗传物质,并命名为卡波西肉瘤相关疱疹病毒(Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus,KSHV)[4]。但其还可引起卡波西肉瘤之外的其他疾病,因此也称为HHV-8。与其他疱疹病毒一样,HHV-8的感染可持续一生。在原发性感染之后,疱疹病毒进入病毒潜伏期,在该时期基因表达水平降至最低,这是一种在人体的最有效的适应以便逃避宿主的抗病毒应答,这给诊断带来不小的挑战。

三、流行病学及传播

与HHV-8感染联系最为紧密的疾病是卡波西肉瘤,该病有4种公认的流行病学类型:①流行性卡波西肉瘤,与HIV感染密切相关,是美国和欧洲卡波西肉瘤的主要型别;②经典型卡波西肉瘤,在地中海地区老年男性常见;③地方性卡波西肉瘤,常见于撒哈拉以南非洲地区;④医源性卡波西肉瘤,常见于器官移植受者。单纯的HHV-8感染并不足以引起卡波西肉瘤。主要的协同因素包括免疫抑制,其原因包括免疫衰退、营养不良、并发疾病、抗排斥药物或者艾滋病[5]。HHV-8是唯一一种在全球大部分地区流行率较低的人类疱疹病毒。北美、北欧和西欧地区的HHV-8血清流行率较低(<5%),在上述地区卡波西肉瘤的发病几乎局限于与患艾滋病的男性发生男男性接触者,还有一部分见于器官移植受者[6]。

HHV-8通过唾液传播,包括不经意的传播和性传播。在非洲的某些地区,HHV-8感染属地方流行性,可通过水平传播和偶然传播,通常在儿童早期就发生。在该病毒不是地方流行性的国家,包括美国,HHV-8的传播通常都是由于性接触引起的,且局限于男男性接触者。异性之间的传播极为罕见,原因尚不明朗[7]。HHV-8也可通过注射毒品引起传播[8]。HHV-8通过输血传播的报道仅在某些HHV-8血清流行率较高且血液制品未经过去白细胞处理的国家,如乌干达[9]。通过器官移植传播HHV-8的发生率随着地区的HHV-8血清流行率升高而升高[10],这一现象是目前HHV-8诊断方面的研究热点,因为HIV-阳性患者接受移植或作为器官供体的人数越来越多[11]。

四、临床意义

(一)卡波西肉瘤

HHV-8与EB病毒、HPV和HBV是少数能

够引起人类恶性肿瘤的几种DNA病毒。HHV-8可引起卡波西肉瘤，通常表现为皮肤和黏膜的红紫色到深棕色损伤。皮肤损伤的外观多变，有凸起的结节样（图105-1）或平的斑块样（图105-2）。下肢是皮肤损伤的好发部位，常伴有淋巴水肿，该病可造成疼痛和外观损毁，淋巴结及内脏器官（肺、胃肠道、肝和骨）亦可受累，肺部卡波西肉瘤可造成疾病发病率和死亡率显著增高。卡波西肉瘤疾病活动性增加与多种并发感染有关，如肺孢子菌性肺炎[5-12]。



图105-1　1例男性艾滋病患者躯干的典型卡波西肉瘤结节，见彩插

从病理学的角度上说，卡波西肉瘤引起的损伤具有梭形细胞、不规则血管网络及细胞炎性浸润等特征。渗出的红细胞是色素过度沉着的来源，该疾病因此被临床医生发现[13]。卡波西肉瘤可随着免疫重建而长期缓解。北美和欧洲的艾滋病人群的卡波西肉瘤发病率随着采用联合抗逆转录病毒治疗（combined antiretroviral therapy, cART）而显著下降[14]。虽然疱疹病毒特异性抗病毒药物可预防卡波西肉瘤的发生，尤其是更昔洛韦，但其严重的不良反应使得这类药物不能用



图105-2　从足部卡波西肉瘤斑块突起的外生性肿瘤，见彩插

于该适应证，因为联合抗逆转录病毒治疗对卡波西肉瘤的预防和治疗均有效[15]。移植后发生的卡波西肉瘤大部分可以通过调整免疫抑制水平来治疗，而不是直接治疗卡波西肉瘤。

（二）原发性渗出性淋巴瘤、多中心卡斯特莱曼病和KSHV炎性细胞因子综合征

有3种较为不常见的HHV-8相关疾病，分别为原发性渗出性淋巴瘤（primary effusion lymphoma，PEL）、多中心卡斯特莱曼病（multicentric Castleman disease，MCD）和KSHV炎性细胞因子综合征（KICS）。PEL是一种罕见、侵袭性强的非霍奇金淋巴瘤，好发于体腔，但通常并无明显的肿瘤包块。该病典型地见于PLWA患者，也可在其他免疫缺陷状态的人群见到。PEL只占了所有艾滋病相关非霍奇金淋巴瘤病例的4%[16]。实际上所有PEL患者均带有HHV-8，其中1/2的患者同时感染EB病毒[16-17]。MCD具有全身症状和弥漫性淋巴结病。HHV-8与MCD引起的浆母细胞转化有关，这种浆母细胞转化在HIV感染人群中更常见。该病需要采用组织病理学诊断，且常在淋巴结穿刺样本中发现卡波西肉瘤[17]。实验室

检查的异常结果包括贫血、全血细胞减少、高丙种球蛋白血症及炎症标志物上升[17]。KICS 是另一种 HHV-8 相关的炎性综合征，临床表现与 MCD 相似，但缺乏 MCD 病理学的诊断特征。卡波西肉瘤常伴随 KICS，其中 HHV-8 和细胞炎症因子水平上升[18]。

五、标本的采集、运输和存储

HHV-8 病毒载量较低，通常检测不到，因此血清学试验是证实 HHV-8 感染的首选方法。在大部分检测 HHV-8 的血清学方法中，血清和血浆可以互相替代，血清和血浆的标准采集和储存流程适用于 HHV-8 的血清学试验。PCR 主要用于检测血液中 HHV-8 的病毒载量，因为它可以预测疾病风险和评估对于治疗的应答(在下文“核酸检测”中讨论)。病毒载量测定的首选样本种类是全血或 PMBC，而非血浆，因为 HHV-8 主要是是细胞相关的(译者注：此处意为“病毒是和细胞结合在一起的”)。病毒 DNA 常存在于唾液中(比血液更常见)，可用于传播和流行病学研究。所有用于 PCR 检测的体液和组织标本在检测前应当在收集完成后保存于－80～－60℃。

六、直接检测

(一)抗原检测

免疫组化和原位杂交可在被感染的组织中直接检测病毒转录组和蛋白质。上述 2 种方法在具有不典型病理表现的皮损上确诊卡波西肉瘤，以及在具有梭形细胞的其他病变排除卡波西肉瘤，均十分有价值。它们可将病毒表达和一个特定的疾病过程联系起来，继而更好地了解病毒致病机制和采用更精准的靶向治疗[26-28]。

(二)核酸检测

大部分感染 HHV-8 的个体在血液中均不具有可检测到的病毒 DNA，因此，PCR 不是一种有效的 HHV-8 感染筛查试验。在 30%～50%的艾滋病伴卡波西肉瘤患者，以及 5%～20%的 HIV 感染者且 HHV-8 血清学阳性，但没有 KS 的患者血液中可检测到 HHV-8 DNA，然而，在 HHV-8 血清学阳性但 HIV 阴性人群中的血液中极少检出[19-21]。PCR 检测的临床价值在于提供关于疾病风险、传播途径及抗病毒治疗应答方面的信息[21-22]。Engels 及其团队对 132 例 HIV 感染的男男性接触者且未患卡波西肉瘤的血样开展 HHV-8 的 PCR 检测，其中 31 例后来发生了卡波西肉瘤。研究显示在卡波西肉瘤诊断前一年具有 HHV-8 病毒血症的男性与未具有病毒血症的男性相比，卡波西肉瘤发生风险上升 10 倍[22]。Laney 及其研究团队以 4 个月为间隔随访跟踪了 96 例 HIV 和 HHV-8 感染的男男性接触者约 2 年，其中 47 例罹患卡波西肉瘤。该团队发现卡波西肉瘤严重程度的改变和 HHV-8 病毒载量具有关联。他们的数据不足以建立疾病风险的病毒载量阈值，但疾病进展的个体出现病毒载量大于 10 000 个基因组拷贝/百万个细胞的概率是疾病好转个体的 8 倍[21]。Engels 和 Laney 发表的论文所引用的某些规模较小的研究同样报道了相似的关联，即 HHV-8 病毒血症和卡波西肉瘤严重程度存在相关性。多种针对病毒基因 *ORF26*[4]、*ORF25*[23]、*K6*[24]和 *ORF73*[25]的 PCR 引物序列已有报道，且目前已有商品化的 PCR 检测试剂(表 105-1)。HHV-8 DNA 在卡波西肉瘤皮损样本中含量极高，但穿刺样本的采集过程对于患者来说较为痛苦，因此不在诊断标准内。

七、分离程序

目前尚未开发出从临床样本中进行 HHV-8 分离的细胞培养系统。虽然 HHV-8 可感染多种宿主细胞并潜伏其中，但目前尚不能证实临床分离株在细胞系中进行有效的病毒复制和传代。自然感染 HHV-8 的人类 B 细胞广泛应用于血清学诊断试剂的制备。在大部分细胞中，该病毒处于潜伏状态，可被刺激剂如佛波酯(十四烷酰佛波醇乙酸酯)和丁酸钠所诱导。

表 105-1　HHV-8 商品化诊断试剂(Commercial diagnostic tests for)

检测类型和公司	检测方法	货号	联系方式[a]	认证情况 (FDA[b]/CE)
IgG 抗体				
LabCorp	免疫荧光法(全细胞)	841155	800-762-4344	无/无
QuestDiagnostics, Inc.	免疫荧光法(全细胞)	37959	866-697-8378; https://www.questdiagnostics.com/testcenter/TestDetail.action?ntc=37959	无/无
Advanced Biotechnologies	酶联免疫吸附试验(全细胞)	15-501-000	https://abionline.com/product/kshvhhv-8-igg-antibody-elisa-kit/	无/无
Advanced Biotechnologies	免疫荧光法(全细胞)	2014 年停产	2014 年停产	2014 年停产
DiaSorin	免疫荧光法(全细胞);未在美国销售	V18 HHV-8	800-328-1482; https://www.diasorin.com/en	无/无
PCR				
LabCorp	定量	009985/45700	800-762-4344	无/无
QuestDiagnostics, Inc.	定量	19798	866-697-8378; https://www.questdiagnostics.com/testcenter/TestDetail.action?ntc=19798	无/无
ARUP Laboratories	定量	2013089	800-522-2787; http://ltd.aruplab.com/Tests/Pub/2013089	无/无
bioMérieux, Inc.	多重检测 HHV-6, HHV-7, HHV-8, CMV	69-100B-01 R-Gene	http://www.biomerieux.co.uk/product/cmv-hhv678-r-gene	有/有
Bioron	定量	2015 年停产	2015 年停产	2015 年停产

注:[a] 并非所有公司主页都列出 HHV-8 试剂盒,可能需要电话联系;[b]FDA. 美国食品和药品监督管理局

八、鉴定和分型系统

HHV-8 DNA 可通过 PCR 检测和对病毒蛋白和转录子进行免疫组化/原位杂交染色检出。可通过对病毒 DNA 进行特定序列的测序以鉴定基因组亚型,通常用于传播和流行病学研究,并非临床诊疗的常规。

九、血清学试验

卡波西肉瘤通常采用临床诊断,除了皮损活检的组织学检测之外,一般不涉及实验室检测。HHV-8 血清学试验的主要用途是在流行病学或临床研究中确定 HHV-8 感染。目前不使用 PCR 来确定 HHV-8 感染,因为大部分患者在没有其他疾病的情况下其病毒血症的水平极低,无法用 PCR 检测。

大部分已公开发表的 HHV-8 血清学试验都由研究性实验室开发,尚未商业化。现有的 2 种主要检测方法,一种是基于人类 B 细胞的免疫荧光试验,该细胞是 HHV-8 自然感染的,既可以表达裂解病毒抗原也可以表达潜伏病毒抗原,另一种则是基于单个的病毒蛋白或多肽的酶联免疫吸附试验(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)。有几项研究比较了 HHV-8 血清学试验的诊断效能,在艾滋病相关卡波西肉瘤患者采集的血清中大多数方法具有 80%～95%的一致性和敏感性,但在不患有卡波西肉瘤的高危人群或献血者的血清中 2 种方法的不一致性相当高(符合率<50%)[20,29-30]。HHV-8 血清学试验的生物学挑战在于该方法在免疫正常人群中微弱的抗体反应,这与个体之间具有不同的抗原有关[31]。另一个挑战是如何获取真阴性血清质控物以评估试验的特异度,因为大部分的 HHV-8 感染均无症状,也不发生可检测到的病毒血症。

不同试验之间的比较研究结果均一致显示基于裂解抗原的免疫荧光试验是敏感性最高的 HHV-8 检测方法(>95%),在经验丰富的实验室

中开展可获得较好的特异性(>95%)[20,32]。但是,免疫荧光试验耗费人力,且结果判读较困难,因此不适合临床使用或用于高通量检测。多个关于 HHV-8 的流行病学研究均采用 2 种美国国立癌症研究院开发的酶联免疫吸附试验,但从美国人群样本估算的敏感性为 80%~90%[29],若想要在临床上使用则需进一步提高诊断效能。为了解决单个检测方法的缺点,大部分的实验室都采用联合开展多种 HHV-8 检测方法以获得更好的敏感性和特异性[20,29-30],但多种检测的诊断程序对于临床应用并不实用。

表 105-1 列出了商业化的 HHV-8 血清学试验试剂,但其中无一经过 FDA 或者 CE 认证。目前在美国可用的试剂是裂解抗原的免疫荧光法(LabCorp 和 Quest)及一种 ELISA(ABI)。但是,2 个大型多中心研究数据提示 ABI 的酶联免疫吸附试验在卡波西肉瘤患者中敏感性极差(<50%)[20,32]。由于可选用的 HHV-8 血清学试验极为有限,因此,迫切需要一种方便且有效的检测方法。

尽管目前还缺乏合适的检测方法,HHV-8 血清学试验在器官移植这一领域受到的关注日益增长。在 HHV-8 地方性流行的地区对器官捐献者和受者及在 HHV-8 非地方性流行的地区对高危人群(男男性接触者和静脉吸毒者)开展血清学筛查实验可能是有保证的[10,33-34]。目前移植学界已经逐渐接受在 HIV 阳性患者中开展肝和肾移植[11],这些患者是 HHV-8 感染和移植后卡波西肉瘤的高危人群。

十、抗病毒药物敏感性

目前尚未见关于使用疱疹病毒特异性抗病毒药物治疗卡波西肉瘤时出现耐药的情况,尤其是更昔洛韦,因为这类药物极少用于治疗卡波西肉瘤。这类药物的费用和毒性限制了其应用于预防性化疗的选择,因为联合 cART 可有效预防卡波西肉瘤。目前尚无证据表明在应用联合抗逆转录病毒药物的情况下,加用抗疱疹病毒药物比单独使用联合抗逆转录病毒药物更有效[35]。

十一、结果的评价、解释和报告

HHV-8 相关疾病的诊断通常采用临床诊断,而不使用 HHV-8 特异性诊断实验。HHV-8 感染的诊断主要采用血清学试验,因为在大部分感染者体内病毒 DNA 不容易检测到。大部分的血清学试验方法均由研究性实验室开发用于内部使用和研究用途。目前对于何种血清学试验最精确尚无共识。HHV-8 PCR 检测更为直截了当,但其用途仅限于关于传播、疾病风险和治疗应答的研究。

本文所述均为作者的观点,不一定代表美国疾病控制和预防中心或 Emory 大学的官方意见。

参考文献请扫二维码查阅

第106章 腺病毒

ALBERT HEIM, RANDALL T. HAYDEN

(周柯、徐修礼 译;汤一苇 审校)

1953 年,Rowe 和同事描述了一种可以使体外培养的儿童腺样体组织出现自发退化的“腺样变性因子”[1]。1954 年,Hilleman 和 Werner 在患有呼吸道感染的入伍新兵中培养出一种称之为 RI-67 类似病毒[2]。随后,该 2 种病毒被证明是相关的,并于 1956 年依据该病毒的最初来源提议命名为腺病毒(adenovirus)。接着,流行病学研究证实腺病毒是引起急性呼吸道、眼及胃肠道疾病的主要病原体。20 世纪 60 年代中期,研究发现人腺病毒可以引起啮齿目动物肿瘤发生,促使人们去进一步揭示它最基本的分子生物学过程,但未找到使人信服的该病毒与人类肿瘤相关证据。近来,腺病毒作为基因传递载体、引起免疫功能不全患者感染的机会病原体,以及人类新发病原体受到相当高的重视。

一、分类学

人腺病毒,归属于腺病毒科(Adenoviridae)、哺乳动物腺病毒属(*Mastadenovirus* genus)。国际病毒分类委员会依据该病毒免疫学、生物学和遗传特性将人哺乳动物腺病毒分为 7 个种(A～G)(表 106-1)。然而,术语“人哺乳动物腺病毒(human mastadenovirus)”在医学微生物学领域并不常用,因此,本章将使用被广泛接受的口头术语“人腺病毒(human adenovirus, HAdV)”。

表 106-1 根据“种”特征所定的 51 个人腺病毒血清型的特点[a]

腺病毒种型	血清型	致癌潜能[b]	% G+C	HA[c]		纤突长度(nm)
				恒河猴	大鼠	
A	12、18、31	强	47～49	−	±	28～31
B1	3、7、16、21、50	弱	50～52	+	−	9～11
B2	11、14、34、35	弱	50～52	+	−	9～11
C	1、2、5、6	无	57～59	−	±	23～31
D	8-10、13、15、17、19、20、22-30、32、33、36-39、42-49、51	无	57～60	±	+	12～13
E	4	无	58	−	±	17
F	40、41	无	52	−	±	18、29

注:[a]修改自参考文献[121],经出版者允许;[b]对于啮齿动物;[c]−. 无血凝;±. 部分血凝;+. 完全血凝

HAdV 每一个种内都存在多个型,每个型则是通过血清学(交叉中和法)进行定义,有多达 51 个(血清)型。GenBank 网站中提供了所有型的完整基因组序列。随后,对在某个疾病(流行性角膜结膜炎)分离出的 22 型病毒株进行测序并发现其具有多个重组基因组,尽管该型病毒株与这一疾病无相关性。该病毒株的大部分基因组来源于与流行性角膜结膜炎相关的 8 型和 37 型,只有中和表位序列源自 22 型[3-4]。因此,提出了一种通过对完整基因组序列进行系统发育分析将新菌株分类为新的(基因)型替代方法,并将上述病毒株标记为 53 型。这种通过重组基因组定义基因型的选择引起了腺病毒学家广泛的分类学讨论[5-9]。以前,有时通过血清学分型检

测的一些重组分离株具有一种血清型(如 7 型)六邻体序列和另一种血清型(如 3 型)纤突序列,由于它们血清学分型[中和试验和血细胞凝集抑制(HAI)]结果相互矛盾而被认定为“中间株”(如 7H3 型)。新近分离株可能会通过基因组测序进行分类,如是新的,则根据基因型(genotypes)定义被标记为新基因型(如 66 型)。最终,组建了人类腺病毒工作组(the Human Adenovirus Working Group,http://hadvwg.gmu.edu/)来协调和标准化新型 HAdV 病毒株分配型别编号的过程。迄今为止,已经有 85 个型别被公认。所有较新型别(52～85 型)都定义为基因型,但仍可选择定义为新的腺病毒血清型(根据血清学标准)。与血清型定义相比,腺病毒基因型定义的优势在于病毒株型别与毒力和临床症状之间的相关性更好。

由于在诊断中通常不必要指出经鉴定的特定腺病毒型别,所以建议使用术语“型别(type)”(如本章所述),除非应强调某种腺病毒型具有血清型或基因型特性(如在免疫或分子进化研究中)。许多新的基因型是同种人类腺病毒的较老血清型的重组体,并可与其中的某一血清型交叉中和,但一些新基因型(如 54 型)也具有新的中和表位,因此也能符合一个新血清型的定义[10-11]。

在一个指定的血清型中,可通过全长基因组测序或限制性酶切分析来定义分子突变体/变异体。这些不同的突变体叫作亚型(subtypes)或“基因组型(genome types)”(不应与基因型混淆),其源于可通过限制性酶切分析(以及全长基因组测序)检出的 DNA 突变,但不产生不同的血清学特性[12]。基因组型设置为型编号之后的小写字母,参考原型以字母“p”表示(如腺病毒基因组型 21p 或 21a)。一些先前报道的基因组型、亚型和中间株比原型株毒力更强或导致不同疾病,根据基因型定义,它们最近已被重新标记为新型别,例如,将基因组型 19a 标定为 64 型[13]。

二、病原体描述

腺病毒为大的、无包膜,直径为 70～90 nm 的二十面体病毒颗粒(图 106-1)。每个病毒颗粒由一个编码约 40 个基因的 36 kb 大小线性双链 DNA 分子组成。DNA 5′端与末端蛋白 5′端以共价连接,并由核心蛋白包裹。还存在一种病毒蛋白酶。病毒衣壳由 7 个结构蛋白构成。主要衣壳蛋白由六邻体、五邻体基座和纤突组成。衣壳主要由 252 个壳粒构成,含有形成 20 个三角形平面的 240 个三聚物六邻体,以及分别位于 12 个顶点的 12 个五邻体。每个五邻体包含一个五聚物基座和三聚物纤突,纤突的长度可变、呈杆状投射,其末端球状突起可与宿主细胞受体相互作用。六邻体具有全部 HAdV 共有的抗原位点,但这些位点均在衣壳内部,所以不能诱导中和抗体的产生。六邻体还含有可以诱导产生血清型特异中和抗体的ε抗原决定簇,位于病毒外表面。病毒纤突主要含有血清型特异抗原决定簇并具有一定的种特异性。纤突球状区域包含有 γ 决定簇,在试管内可引起血凝现象。

尽管 B 种病毒大多数型别和 D 种病毒特定型别通过 CD46 或唾液酸进行黏附,病毒的有效(增

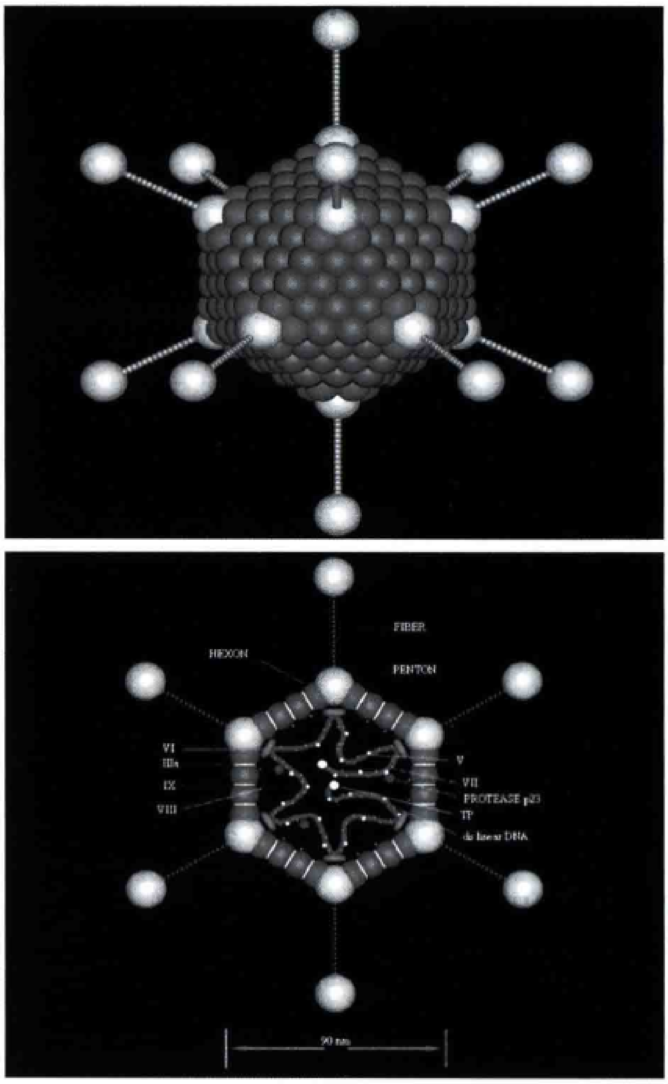


图 106-1 腺病毒颗粒模型。上图示病毒外部;下图示病毒内部,见彩插

殖性)感染是通过纤突球状突起黏附到宿主细胞表面分子如柯萨奇-腺病毒受体启动的。这种相互作用的特异性是病毒组织嗜性(tissue tropism)的重要决定因素。在衣壳与整合素发生次级相互作用之后,病毒颗粒通过胞吞进入细胞,进而转移至细胞核启动病毒转录及DNA复制。病毒的结构蛋白在细胞质内合成,也转移至细胞核内进行病毒颗粒组装并聚集形成晶体阵列(图106-2a)。增殖性感染导致每个细胞内产生1万到超过100万个病毒颗粒,其中仅1%~5%具有感染性。

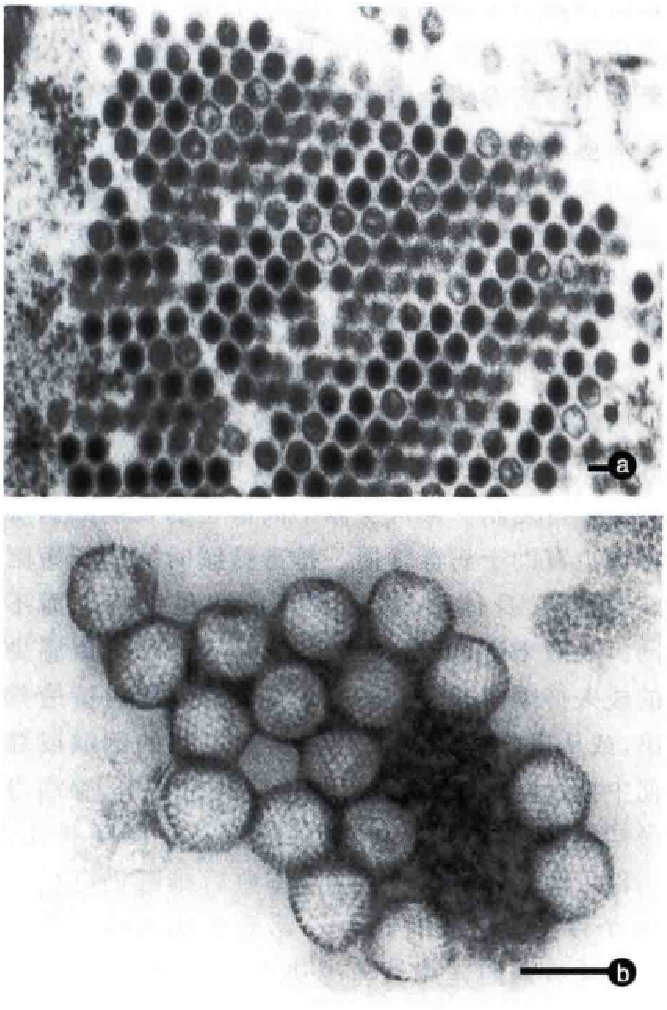


图106-2 腺病毒颗粒的超微结构

注:a. 一个含有完整的(黑色)和空的(清晰的)腺病毒颗粒的肝细胞核的透射电镜形态;b. 腹泻儿童粪便中成簇的腺病毒颗粒的直接电镜形态。标尺为100 nm

腺病毒潜伏感染继发于急性感染,但人们对于潜伏感染所知甚少。早期的研究显示病毒潜伏大多与无症状幼儿的扁桃体和腺样体黏膜T淋巴细胞中的腺病毒C种密切相关。最新研究显示潜伏感染涉及的腺病毒种型更为广泛,并证实在胃肠道相关淋巴样细胞中存在病毒基因组物质[14-16]。相似的病毒聚集点也可能在身体其他部位。最大载量病毒DNA可在幼儿组织中检测到,提示病毒储量可能随着年龄增长而减低[17]。相反,健康个体外周血(循环血白细胞)有时可检出低水平病毒DNA(<1000拷贝/ml)[18-20]。

三、流行病学和传播

腺病毒感染常见且普遍存在。在所有呼吸道感染中,1%~5%是由腺病毒引起的,但儿童所有呼吸道感染的2%~24%及所有急性腹泻的5%~15%都是由腺病毒所致,并且在未接种疫苗的入伍新兵中所有呼吸道疾病的30%~70%由腺病毒引起。大多数感染发生在出生后最初几年,约半数没有症状。到10岁左右,很多儿童已经感染过一个或多个型别的腺病毒。据记载人类可以同时感染不同型和种的腺病毒,在身体不同部位采样检测时更是如此[21]。在相对拥挤封闭的环境如托儿所、寄宿学校、敬老院、军事训练营、医院等,腺病毒感染的发生率最高。家庭内感染是常见的。不同性别及种族间的易感性没有明显区别。腺病毒感染流行遍及世界各地,只是在其他地区由不同型别引起的感染症状有所差异。

腺病毒感染可以是流行性、地方性或散发性,其流行模式、特异的临床综合征及严重程度可因型别、感染人群及感染途径的差异而不同。全年均可发生散发感染。

呼吸道感染主要由HAdV-B、HAdV-C和HAdV-E种所致,其中1、2、5和6型引起流行性感染和随后的潜伏感染(最常见于幼儿),而4、7、14和21型引起冬天到夏初季节常见的小范围流行性感染。美国一项对2004—2006年期间腺病毒分离株的调查显示,一般百姓中最常分离3、2、1和5型,同时可引起严重下呼吸道疾病(lower respiratory tract illness, LRTI)的21型数量增加[22-24]。美国部队新兵中流行的严重呼吸系统疾病通常发生在冬、春季,在历史上4和7型曾是引起这些疾病的最常见原因,随后受到疫苗接种计划的控制。1999年疫苗接种计划终止后,4型病毒流行占主导,同时可少量检出数量较少的B种7型和21型毒株。2011年重新推行疫苗接种降低军队中4型病毒感染的发生率,并减轻呼吸道感染的临床严重性[25]。在军队中还检测到新出现的

14 型(14p1,之前命名为 14a)病毒突变体[22,26],但其引起了美国多个州平民严重下呼吸道疾病的聚集性发病并造成死亡[27]。

多数流行性角膜结膜炎的大范围流行是由 HAdV-D 种 8、37 和 64(之前叫 19a 亚型)型所致,而由 53 和 54 型所致者较为少见,后者似乎在亚洲占主导地位。结膜炎的夏季小范围暴发主要由(HAdV-B、HAdV-E 种)3、4 和 7 型所致,并且与游泳池水污染相关。与流行性角膜结膜炎相反,这类感染几乎不累及角膜。

腺病毒相关胃肠炎主要由 HAdV-F 种 40 和 41 型引起,这些血清型病毒同时被称之为"肠道腺病毒(enteric adenoviruses)",该病毒感染在全球范围内流行,全年均有发生。HAdV-A 种 12、18、31 和 61 型可引起胃肠炎小范围暴发,并且 1、2 和 5 型所致的呼吸道感染也可伴发胃肠炎。

有关原发性或获得性免疫缺陷人群感染腺病毒常有报道[28]。接受造血干细胞移植(hematopoietic stem cell transplantation,HSCT)的小儿受者中腺病毒感染最常见且最严重,感染的发病率高达 30%。该类人群发病的危险因素包括低龄、同种异体移植、T 细胞耗竭、移植物不匹配、脐血移植和严重的移植物抗宿主病[29]。小儿造血干细胞移植受者的大多数感染是由于 HAdV-C 种某些型,甚至可能是其他种,例如,HAdV-A[28,30-31] 所致潜伏感染的内源性激活,但也可以观察到新发感染(*de novo* infections)。HAdV-C 种某些型的感染在所有年龄造血干细胞移植受者明显占主导地位。HAdV-A 种 31 型感染常见于小儿造血干细胞移植受者,而不是成年受者,后者偶见 HAdV-B 和 HAdV-D 种某些型感染[32-33]。不同型别的混合感染或连续感染常见[34]。

实体器官移植受者腺病毒感染的数据相对较少[35],但相对于造血干细胞移植受者,该组患者的感染通常较少且程度较轻。腺病毒感染通常与治疗器官排斥反应的免疫抑制程度增强有关。肾移植患者腺病毒感染的发病率最低,最常感染 HAdV-B 种腺病毒(7、11、34 和 35 型),通常会导致出血性膀胱炎(hemorrhagic cystitis),偶尔会导致移植肾炎。肺、小肠或肝脏移植受者的腺病毒感染更为常见,往往导致移植物功能障碍(或移植失败)甚至死亡,HAdV-C 种(1、2 和 5 型)所致感染最常见。移植患者感染腺病毒可源于受体自身或供体器官内源性病毒再活化,也可能来源于社区或医院。

腺病毒曾引起人类免疫缺陷病毒/获得性免疫缺陷综合征患者发生多种严重感染,大多数由 D 种病毒某些型引起,这些型别在其他疾病中很少被检出[36]。高效抗逆转录病毒药物治疗的问世极大减少了该群体此类感染的发病率。

腺病毒主要通过呼吸道或粪-口途径传播。空气传播通过飞沫,少数情况可通过较大气溶胶进行传播。大多数的肠道腺病毒感染可能是由粪-口途径传播引起。腺病毒也可通过污染的物体、手指和液体(如滴眼液和污水)传播。眼部创伤可促进感染和角膜结膜炎的传播,后者通过环境中高浓度的空气中病毒悬浮微粒致病。在入伍新兵中腺病毒感染的传播途径可能包括直接接触和通风系统的气溶胶暴露。在此种情况下,身体压力和疲劳可能是促发病毒感染发生下呼吸道严重感染的重要宿主因素。大多数呼吸道腺病毒感染的平均潜伏期是 5.6 天,眼部感染的平均潜伏期是 1 周,胃肠炎的平均潜伏期则是 3～10 天[37]。

由于可耐受多数消毒剂和物理消毒措施,致使腺病毒易于传播。病毒颗粒在胃分泌液、胆汁和胰蛋白酶中的稳定性使得其可通过胃,随后在肠道进行复制。来自身体不同部位的长期的病毒排毒也有助于病毒传播。排毒持续时间的长短因病毒型别、身体部位、患者年龄和免疫状态而不同。一般来讲,非肠道腺病毒可从上呼吸道感染的成人持续多日排出,在眼部感染数周内持续排出,或从患呼吸道或全身性疾病患儿的咽喉或粪便中持续排毒 3～6 周。受感染的患儿中,腺病毒最初可能从呼吸道中排出,随后从胃肠道排出。病毒可间歇性随粪便排出,痊愈后排毒仍可持续 18 个月甚至更长时间[38]。尽管无法从所有的病例排除后来的连续性再感染发生的可能,对儿童肠道活检进行腺病毒 DNA 检测的最新研究明确支持腺病毒潜伏和持续感染的概念[15-16]。相反,HAdV-F 种肠道腺病毒的排毒仅发生在痊愈后几天内。免疫功能不全患者比免疫功能正常人群腺病毒排毒时间更长。

四、临床意义

由于其诸多型别和组织嗜性,腺病毒相关疾病谱十分广泛(表 106-2)。腺病毒感染的临床表现也取决于受感染者的年龄和免疫状态。大多数

表106-2 腺病毒感染的疾病、相关型别、宿主和适当的标本[a]

疾病	相关型别		常见宿主	标本
	常见	不常见		
上呼吸道感染	1～3、5、7	4、6、11、14、15、18、21、29、31	婴儿、儿童	鼻咽吸出物或拭子、咽拭子
下呼吸道感染	3、4、7、14、21、55	1、2、5、7、8、11、35、66	婴儿、儿童、免疫功能不全患者	鼻咽吸出物或拭子、支气管肺泡灌洗液、肺组织
百日咳综合征	5	1～3、12、19	儿童	咽拭子
急性呼吸道疾病	4、7	2、3、5、8、11、14、21、35	入伍新兵	咽拭子、支气管肺泡灌洗液、肺组织、鼻咽吸出物或拭子
急性结膜炎	1～4、7	6、9～11、15～17、19、20、22、37	儿童	结膜拭子或刮片
急性出血性结膜炎	11	2～8、14、15、19、37	儿童	结膜拭子或刮片
咽-结膜热	3、4、7	1、2、5、6、8、11～17、19～21、29、37	儿童	鼻咽吸出物或拭子、咽拭子、结膜拭子或刮片
流行性角膜结膜炎	8、37、53、54、64(＝19a)	2～5、7、10、11、13～17、21、23、29、56	任何年龄个体	结膜拭子或刮片
胃肠炎	40、41	1～3、5、7、12～18、21、25、26、29、31、52	儿童	粪便
出血性膀胱炎	11	7、21、34、35	儿童、免疫功能不全患者	尿
肝炎	1～3、5、7	4、31	婴儿、儿童、免疫功能不全患者	肝组织、血液
心肌炎	7、21		儿童	心脏组织、血液
脑膜脑炎	7	1～3、5、6、11、12、26、32	儿童、免疫功能不全患者	脑组织、脑脊液
性传播疾病	2、37	1、4、5、7、9、11、18、19、31、49	青少年、成人	病损部位拭子
播散性疾病	1、2、5、11、31、34、35	3、6、7、14、21、29、32、37～39、43、45	免疫功能不全患者、新生儿	血、支气管肺泡灌洗液、尿、受累组织

注：[a] 本表修改自参考文献[121]，并得到出版社的授权

感染会影响呼吸道、眼和胃肠道，较少累及泌尿道、心脏、中枢神经系统、肝脏、胰腺和生殖道。实质器官受累和播散性疾病主要见于免疫功能不全患者。

大多数呼吸道腺病毒感染发生在出生后早期，且多为自限性，症状较轻。其常见的症状是发热、鼻塞、鼻炎、咽炎、颈部淋巴结肿大及咳嗽，同时可伴或不伴有中耳炎。据记载，渗出性扁桃体炎在临床上与A组链球菌感染难以区别。已有报道腺病毒感染发生百日咳样综合征，虽然在这种情况下腺病毒更可能是共同病原体或受到再激活，而不是引发此症状的主要病原体。腺病毒在哮喘发病中的作用仍具有争议[39]。腺病毒引起的下呼吸道感染，如哮吼、支气管炎、细支气管炎和肺炎，会十分严重有时可致命，尤其是2岁以下婴幼儿。一些人群经常患有下呼吸道感染的长期后遗症（闭塞性支气管炎、支气管扩张和慢性肺不张）[40]，但需要对该问题进行更多研究。有文章报道腺病毒4（基因组型4a）、5、14（基因组型14p1）、21（亚型21a）和66（之前命名为基因组型7h或中间株7H3）型所致感染，以及当感染伴有肺外表现时可引起更高的死亡率[22-23,41-43]。

1953年起人们开始注意到年轻入伍新兵中频繁暴发腺病毒相关急性呼吸道疾病。其症状包括发热的感冒样疾病、伴扁桃体炎的咽炎、支气管炎和肺炎。其住院率高达50%，严重下呼吸道疾病进而导致急性呼吸窘迫综合征，引起一些患者死亡。针对当时最常见血清型4和7型腺病毒的疫苗于1980年开始在这些人群中应用，大大减少了其疾病发生。1996年疫苗停止生产，新兵发病问题再次发生，直到2011年在军队重新推行疫苗接种（仍然针对血清型4和7型）。尽管目前在军事

机构人员中的暴发流行不像疫苗前时代一样严重,但病毒流行的问题继续存在,并涉及了一系列更为广泛的血清型[22,25]。特别是近年来14型与军营和普通人群中出现的大量暴发流行具有相关性[42-43]。有趣的是,4型腺病毒很少引起平民呼吸系统疾病。

眼部腺病毒感染常见。急性滤泡性结膜炎(acute follicular conjunctivitis)一般为浅表性,症状于数周后消失。有相关报道腺病毒引起的急性出血性结膜炎(acute hemorrhagic conjunctivitis)的流行与肠道病毒引起的相类似。咽结膜热(pharyngoconjunctival fever)是滤泡性结膜炎并伴有上呼吸道症状、发热,偶尔有淋巴结肿大、咽炎和不适感。所有这些感染都不累及角膜,通常由HAdV-B和HAdV-E种3、4和7型引起,但还包括其他多种型别。流行性角结膜炎是一种更为严重的感染疾病,以结膜炎起病可进展至角膜糜烂和浸润而损伤视力,并引发眼睑疼痛性水肿。炎症症状可能在2周内消退,然而由慢性角膜浸润[译者注:"nummuli",指感染急性期后出现肉眼可见的角膜点状或融合状损伤(原文为numuli是拼写错误)]所致的视力下降,以及畏光、异物感可能会持续数月到数年。大多数流行性结膜炎病例是由8、37、53、54和64型引起,它们都属于HAdV-D种的成员。

40型和41型肠道腺病毒是2岁以下幼儿的病毒性胃肠炎的常见原因(表106-2)。腹泻通常为水样便不含血,不伴有粪便白细胞增多,且平均持续10天,比轮状病毒引起的腹泻时间要稍长[44]。患者可出现轻微发热、呕吐和腹痛,有时会伴有呼吸系统症状。虽然经回肠造瘘术或结肠造瘘术的婴儿可出现症状迁延,也已有罕见的死亡的报道,但大多数免疫功能正常的患者恢复良好。罕见的非肠道腺病毒感染相关的胃肠综合征包括肠套叠、急性肠系膜淋巴结炎和阑尾炎。

免疫功能不全患者腺病毒感染的临床表现取决于个人基础疾病或移植器官、患者年龄及感染病毒的型别[31,45-46]。造血干细胞移植患者的表现常常以胃肠道内源性病毒再活化(无症状或有症状的随粪便腺病毒排毒)开始,或者以呼吸道或胃肠道较不常见的新发感染开始。疾病可累及单个器官(如出血性膀胱炎、肺炎、肝炎、肠炎),但可常常观察到播散性疾病。这包括与高水平病毒血症(通过定量PCR检出的DNA血症)相关的脓毒血症样症状和多器官感染(如肝炎和肺炎),造成的死亡率较高(某些研究中超过80%)[47-48]。

实体器官移植患者的感染可能累及移植物或其他系统器官。在肝移植患者感染后最常伴有腹泻、移植肝炎和肺炎[49-50]。小肠移植受者感染后会出现小肠结肠炎,偶尔波及肝。肾移植术后患者感染后的主要临床表现为急性出血性膀胱炎,较小程度上为移植肾肾炎和肺炎[51]。如果不进行腺病毒诊断,移植肾炎可能会与排斥反应混淆,并且增强免疫抑制作用可能会导致移植物损失。最近研究也报道了其他器官的系统性损害[52]。肺移植受者的移植物感染可引发坏死性肺炎,导致呼吸衰竭和进行性的移植物功能丧失,疾病后期可以发生闭塞性细支气管炎。

在高活性抗逆转录病毒治疗后时代,人类免疫缺陷病毒感染患者的临床症状不常见。已有获得性免疫缺陷综合征患者并发腺病毒相关肺炎、脑膜脑炎、肝炎及播散性疾病。

腺病毒感染的不常见临床表现为皮疹,严重且常致命的新生儿疾病,神经系统表现如脑膜脑炎和脑炎,健康人的急性心肌炎或心脏移植患者的移植物排斥,巨噬细胞活化综合征,泌尿生殖系统疾病包括生殖器损伤和尿道炎。尚不清楚腺病毒是否导致胎儿死亡。最近研究发现腺病毒36型与肥胖有关[53],但这种关联存在争议。有些腺病毒感染出现类似川崎病(Kawasaki)的症状,然而,有报道称腺病毒感染也伴随川崎病的发生,所以对这些疾病的诊断应保持谨慎[54]。通常,使用高敏PCR检测腺病毒DNA可能会产生误导,因为腺病毒潜伏感染会造成PCR阳性结果,与其他病原体引起的任意疾病存在巧合。腺病毒DNA定量检测有助于鉴别与疾病相关的腺病毒复制和潜伏感染。

五、标本的采集、运输和存储

在病程早期的病损部位最容易检测到腺病毒。根据不同的临床症状和检测要求而采集合适的标本(表106-2)。采集富含细胞的标本通常大幅提高敏感性。在检测包括腺病毒的呼吸道病毒时,植绒尼龙拭子(Copan Diagnostics,Murrieta,CA)采集到的细胞量要高于棉拭子或鼻咽吸出

物[55-57]。当怀疑有深部感染、播散性感染或受感染部位组织不易获取时，建议采集多个部位（如呼吸道、粪便和尿）或血液标本。

为达到最优的病毒复苏，需将标本低温保存（2～8℃）、转运并按之前章节所述方法处理。合适的病毒转运培养基可在实验室制备或从商家购买。一些商品化制剂如 MicroTest 复合微生物培养基 M4RT（Remel，Lenexa，KS）或通用转运培养基 UTM（Copan），可以使病毒在室温下长时间保持感染性，同时也适用于病毒抗原或 DNA 检测[58]。需检测的血浆或血清样本时应在收集后几个小时内进行分离。标本、病毒分离株或 DNA 提取物可在－70℃下长期冻存以维持最大活性。用于腺病毒 DNA PCR 检测的标本也可以储存在－20℃冰箱。标本长期储存于自动除霜冰箱或者标本的反复冻融最终会导致腺病毒感染性降低及 DNA 降解，此条件不建议用于任何临床标本的储存。

大多数物理和化学方法对腺病毒不能达到灭活的作用。大多数病毒型别可以在 36℃ 稳定 1 周，在室温稳定数周，而在 4℃时稳定数月。病毒的感染性可以在纸上或生理盐水中维持数周，并在无孔隙表面维持一个多月。严格遵守常规安全措施，如使用个人防护装备和生物安全柜，消毒工作台和洗手，可以最大限度减少实验室感染。由于腺病毒对黏膜和眼组织的亲和性，需避免手-眼或手-口接触。消除感染的方法包括以 1∶10 稀释的家用含氯消毒剂（0.5％次氯酸钠）浸泡 30 min，加热至 56℃30 min 或 60℃ 2 min，以及高压灭菌。要注意腺病毒 4 型尤其耐热。含乙醇洗手消毒凝胶可以达到灭活目的，但部分产品可能需要数分钟的接触时间。也可用碘伏、甲醛和紫外线灯来进行消毒。感染性消失以后很长时间仍可检出病毒 DNA。

六、直接检测

1. 显微镜检查 可以在苏木素-伊红或瑞-姬氏染色的组织、液体标本沉淀或培养物中，通过光学显微镜下观察到腺病毒感染的细胞——“污秽细胞（smudge cells）”，这种细胞是一种个体较大的感染晚期细胞，内含单个、居中、嗜碱性由腺病毒颗粒组成的核内包涵体（图 106-2a）。其他类型包涵体也有相关记载[59]。腺病毒包涵体可被误认为是巨细胞病毒、单纯疱疹病毒及多瘤病毒的包涵体。建议通过免疫组织化学和原位杂交方法进行进一步检测以避免误诊[60-61]。腺病毒颗粒具有的特征性形态使其仅需电子显微镜（electron microscope，EM）检查即可明确，而不需要后续鉴定。通过透射 EM 可以观察到感染细胞的病毒颗粒常形成大型晶体阵列（图 106-2a）。急性腹泻儿童粪便中含有大量病毒（10^6～10^9 颗粒/ml），可通过 EM 直接检测（图 106-2b）[62]。可通过超速离心、抗病毒六邻体抗体标记的免疫 EM，或检测前使用特殊的超速离心转头（Airfuge；Beckman Coulter，Inc.，Fullerton，CA）使病毒在 EM 检测载网上富集等技术，从而使直接 EM 检测的敏感性提高[63]。很少有临床实验室具有 EM 设施，因此通常使用其他方法。

2. 抗原检测 抗原检测可以用于呼吸道、眼和胃肠道标本中腺病毒的快速检测。抗原检测的敏感性通常较差，特别是对成人或免疫功能不全患者进行测试时，或者与分子生物检测法相比较时[64-65]。大多数抗原检测的靶点是腺病毒六邻体蛋白的保守区域，并使用单克隆抗体。免疫荧光、酶免疫分析和侧流免疫层析法是最常见的检测方法。

免疫荧光法可以用于培养病毒分离株的明确鉴定及初步检测呼吸道感染。含有后鼻咽部或中鼻甲脱落纤毛柱状上皮细胞的灌洗液、吸出物和拭子都是直接抗原检测的适宜标本。新鲜组织的压片，以及冰冻组织或福尔马林固定的组织切片也可以用来进行抗原检测。然而，对于某些指定的商业化的试剂，这些标本类型尚未被批准使用。因此，在临床应用前，还需要进一步验证。在第 82 章中已经描述了免疫荧光技术的一般方法。阳性细胞通常会显示为细胞核内浓缩的或胞质中颗粒状的着色（图 106-3）。虽然间接免疫荧光法高度敏感和特异，但是直接免疫荧光法也可以提供满意和快速的结果[66]。可以采用单独标记的抗腺病毒单克隆抗体或用标记不同荧光染料的腺病毒和其他呼吸道病毒单克隆抗体的混合物进行荧光免疫检测。对于一些腺病毒低发地区实验室，这种含多种呼吸道病毒单克隆抗体的混合物可能是最经济的方法。有文章报道用免疫荧光法检测呼吸道腺病毒敏感性是细胞培养法的 40％～

60%，这低于大多数其他呼吸道病毒的检出率。使用细胞离心和儿童患者的标本进行免疫荧光检测，其敏感性(60%～80%)比培养法高[66]。大多数研究证实免疫荧光法检测腺病毒的特异性很高(>99%)。

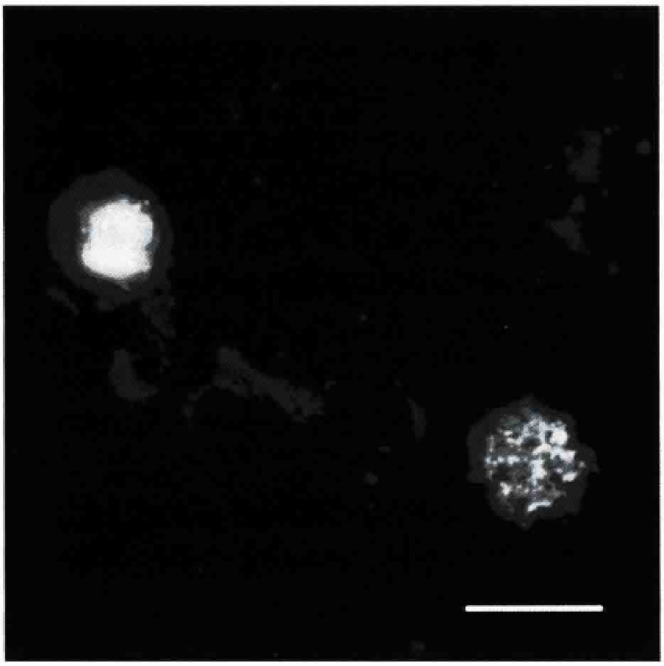


图 106-3 鼻咽吸出物中 2 个含有腺病毒抗原的细胞。使用标记了罗丹明的抗体(黄色)进行直接免疫荧光检测，标尺为 40 μm，见彩插

抗原检测也可以通过酶联免疫法、免疫层析法或乳胶凝集技术完成。这些技术在其他章节已进行充分地描述。可使用的酶联免疫检测法有 2 种，一种是针对 40 和 41 型进行特异性检测，另一种是对所有型别进行检测[67-68]。这 2 种检测利用微孔板和腺病毒特异性单抗作为抗原捕获和检测的试剂。这种方式对于通常以成批处理模式检测的大型实验室是最经济的。大部分研究发现，与 Graham 293 细胞培养法或电子显微镜法相比，酶免疫法检测 40/41 型的敏感性>90%，但在一些变异的毒株中，其敏感性会出现降低[69]，而该方法的特异性>97%。通用酶联免疫法可在同一反应中检测腺病毒 F 和其他种型。一些研究显示当对粪便进行测试时，该方法具有高敏感性(>95%)，但对其他类型标本进行检测的敏感性只有 65%～75%。尿标本检测敏感性可能为最低，并偶尔产生假阳性反应[67,70]。

层析法对于小型实验室具有吸引力，因为这种检测可以单个标本的形式运行，并且通常能在 30 min 内出结果。SAS 快速腺病毒测试(SA Scientific，San Antonio，TX)是一种膜免疫金标检测(membrane-based immunogold assay)，主要针对眼拭子、鼻咽分泌物和粪便进行测试。最初的研究表明与培养和 PCR 方法相比，该方法检测鼻咽样本中腺病毒的敏感性达 84%～95%，但对更加广泛的标本类型做进一步评估时，其敏感性仅有 55%[64,71]，而对幼儿标本检测的效果最好。AdenoPlus(Quidel，San Diego，CA)是一种用于检测眼拭子标本的侧流免疫层析法，并被作为即时检验销售。和 PCR 检测相比，2 项研究报道该方法敏感性分别为 85%和 39.5%，存在矛盾；但 2 项研究所报道的特异性较高，分别为 98%和 95.5%[72-73]。

3. 病毒核酸检测 核酸检测因灵敏、快速的病毒检测和定量而为人们所熟知。事实上，利用 PCR 或者类似的扩增方法，可从几乎所有类型的标本中检出腺病毒，所以，选择恰当的标本类型在很大程度上取决于相关的疾病(表 106-2)。几乎在所有报道中，无论使用何种特定方法，PCR 方法的敏感性通常都超过了抗原检测或培养的敏感性[74]。直接检测病毒 DNA(不经过扩增)是可行的，如限制性内切酶消化和凝胶电泳检测粪便标本，以及通过原位杂交技术检测组织标本。但由于高敏 PCR 方案的存在，直接检测方法已几乎不再用作诊断步骤。

腺病毒全部型别的检测代表了测试开发工作的巨大挑战。因此，验证这类检测方法对有临床重要性的腺病毒全部型别检测的敏感性，是开发者和使用者义不容辞的责任。当使用非型特异性(non-type-specific)的校准曲线时，应针对可检测的病毒型别进行跨型别的共线性(colinearity)评价，以确保病毒定量检测的准确性。计算不同病毒型别的扩增效率有助于共线性评估。一些健康对照人群的样本也存有腺病毒 DNA，这是由于病毒 DNA 在有症状感染后持久存在，或发生无症状腺病毒感染，因此无论何时，只要有可能，也需要确定检测的临床特异度。平均有低于 2%的健康人标本中含有低浓度腺病毒 DNA，即便是定量结果在不同患者和标本类型(如全血与血浆/血清)中具有显著的差异[18-20,75]。在慢性疾病(如哮喘)中，扁桃体和腺样体组织，以及病理阴性的胃肠活检标本中腺病毒检出率略高[17,39,76]。每个实验室

应该根据特定患者群体和标本类型设定PCR阳性结果的临床意义。对于定量检测,可以建立阈值以提示阳性结果的临床意义。在实时定量PCR检测时,循环阈值(threshold cycle values)可能有助于从腺病毒DNA持续存在的情况中辨别具有临床意义的急性感染,但必须仔细验证循环阈值。

终点法和实时PCR扩增都是当前常见的检测方法。由于六邻体、纤突蛋白基因或者病毒相关RNA的Ⅰ区和Ⅱ区在病毒的各型别间具有高度的同源性,因此,针对这些基因选择简并(degenerate primer)或非简并的引物和探针。多数测试使用多重引物和探针用于所有型别腺病毒的统一检测和定量分析,而使用单个引物和探针组合也是可行的[19,77-81]。多年来,有文献报道了大量实验室自建项目。最近,被批准用于腺病毒体外诊断(表106-3)的商品化测试已经问市[82-85]。虽然大部分被批准的测试仅仅用于呼吸道或胃肠道感染的检测,这些测试的问市也反映出了人们在快速、准确地检出腺病毒感染的能力方面已获得了巨大的进步。

表106-3 在美国上市的可用于检测腺病毒感染的商品化PCR检测(经FDA许可或批准[a]),作为单重PCR或多重PCR测试的组成部分

制造商	测试名称	标本类型/DNA提取源[a]	检测腺病毒型别	检测形式
Luminex Molecular Diagnostics	xTAG呼吸道病毒组合测试卡(xTAG RVP和xTAG RVP FAST)	鼻咽拭子	未指定(可能是所有呼吸道相关型别)	广谱呼吸道组合测试卡/终点检测
Luminex Molecular Diagnostics	xTAG胃肠道病原体组合测试卡	粪便	40和41型	广谱胃肠道组合测试卡/终点检测
bioMérieux(BioFire)	FilmArray呼吸道组合测试卡2(RP2)	鼻咽拭子	HAdV-A、B、C、D、E和F种的23个型别(可能为通用型)	广谱呼吸道组合测试卡/终点检测
bioMérieux(BioFire)	FilmArray呼吸道组合测试卡(RP)	鼻咽拭子	HAdV-B、C和E种的型别[85]	广谱呼吸道组合测试卡/终点检测
bioMérieux(BioFire)	FilmArray胃肠道组合测试卡	粪便	40和41型	广谱胃肠道组合测试卡/终点检测
GenMark Diagnostics	ePlex呼吸道病原体组合测试卡	鼻咽拭子	(可能是所有呼吸道相关型别)	广谱呼吸道组合测试卡/终点检测
Hologic Gen-Probe	Prodesse ProAdeno+测试	鼻咽拭子	1~51型(可能为通用型)	仅检测腺病毒/实时检测
bioMérieux公司	腺病毒r-基因(Adenovirus r-gene;U.S.)测试	鼻咽拭子、灌洗液和吸出物[a]	1~60型(可能为通用型)	仅检测腺病毒/实时检测
Quidel公司	Lyra腺病毒测试	鼻拭子和鼻咽拭子[a]	1~52型(可能为通用型)	仅检测腺病毒/实时检测

注:[a]根据网址https://www.fda.gov/MedicalDevices/ProductsandMedicalProcedures/InVitroDiagnostics/ucm330711.htm#microbial,2017-06-13可访问

终点PCR法的检测形式包括凝胶电泳、DNA印迹或在微孔板上进行的液相杂交和捕获,以及液相或固相芯片法[86]。目前,对所有型别的腺病毒进行检测的传统方法,以及对腺病毒、疱疹病毒和他呼吸道病毒进行多重PCR检测的方法均有报道[21,87-88]。更多、更高级的涵盖全部呼吸道病毒的多重检测方法已经研发并已上市[82-85]。这些检测系统中不同检测平台和不同年代产品,检测腺病毒的敏感性和病毒型别范围的差异很大。一些系统的早期产品在检测腺病毒较其他呼吸道病毒暴露出明显的不足。但是,生产厂家在随后的产品中将这些问题得以改善[85],因此在产品应用前严格地评估这类检测对于所有诊断相关病毒型别的敏感性是至关重要的。当检测靶标单独为腺病毒

时，一般最常选用实时 PCR，而不用组合测试。因为，实时 PCR 与终点 PCR 法相比，不但更快速、更不易污染，而且能提供定量结果。目前，已有很多实时的实验室自建项目的报道[19,63,77-79,81]，市面上还有商品化实时 PCR 检测，而这些美国市场上所有检测都声称仅对腺病毒 DNA 进行定性检测。借助这些测试进行定量可能可行，但需要实验室借助外部标准进行充分验证。欧洲(欧洲共同体 CE 认证的)版本的 bioMérieuxR-Gene 测试可提供腺病毒 DNA 定量检测。

实时定量 PCR 的主要应用是对腺病毒 DNA 血症进行检测和定量，以预测免疫功能不全患者现发或初发的播散性腺病毒疾病[89-90]。对病毒 DNA 血症的检测和定量可利用血浆、外周血单个核细胞、或者全血进行。对这些标本类型进行检测的敏感性没有显著的差异，尽管最新的一项研究显示全血和血浆的病毒载量略高于外周血单个核细胞[91]。定量检测也被广泛应用于其他类型标本的检测，如粪便，以致力于提高阳性结果的临床预测价值[92]，或实现造血干细胞移植患儿病毒再激活的早期诊断[46]。高病毒载量与造血干细胞移植患者的急性感染和有临床意义的病毒再激活明确相关。

现在，许多移植中心都在利用定量检测来评估 DNA 血症，一般是在移植后和出现症状之后的数月之内每周对移植患者进行病毒定量检测。常规筛查对造血细胞移植的患儿尤为常见。对无症状患者的筛查可用于启动预防性治疗[29]。建议将 1×10^4 拷贝/ml 的阈值应用于启动预防性治疗，因为较低的病毒载量不会影响死亡率[33,93]。然而目前通常还没有能推荐给临床的病毒 DNA 血症的单一阈值，这是由于检测方法的特性和患病群体间的差异，以及缺乏通用的校准标准。一些专家对患者体内的病毒载量进行动态变化监测，具体做法是在检出单次低病毒载量后 2 或 3 天重复检测，从而发现在初始治疗前病毒水平快速增加的患者。对于已诊断为腺病毒感染的患者，病毒载量值的变化能用于评估抗病毒药的临床疗效和判断预后[94]。

七、病毒分离程序

虽然，病毒分离法曾被视为参考标准，但现在的应用在逐渐减少。病毒分离培养比抗原或 DNA 检测法更费时，而且在某些标本类型检测的敏感性要低于 PCR。但是，在检测一些可能被直接检测所遗漏的型别时，病毒分离仍具有使用价值；此外，由于分离培养后能产生具有感染性的子代病毒，有利于后期的鉴定和分型工作。大部分类型的标本都适宜于分离培养(表 106-2)。而血液和脑脊液除外，因为在这些标本中所含病毒量少，或者所含病毒被抗体中和。对这些类型的标本，应该首选 DNA 扩增。

腺病毒在人上皮细胞内生长最佳。原代人胚胎或者新生儿肾细胞最易感，但这些细胞很难获得。因此，可使用人上皮细胞系，如 A549 和 Hep2，有时也用 Hela 或者 KB 细胞。人成纤维细胞和非人类细胞，如 Vero 和含有内源性猿猴病毒 40 的原代猴肾细胞，可能会支持腺病毒复制，但是病毒产量却不高。肠道腺病毒(HAdV-F 种)通常被称为“苛养的(fastidious)”，因为这类病毒无法培养或者在常规细胞系中生长缓慢。Graham 293 细胞培养肠道腺病毒成功率最高[44]。

腺病毒可用常规试管法培养或者壳瓶离心培养(shell vial centrifugation culture，SVCC)，详见前面的章节。虽然壳瓶离心培养因其能快速出结果而受欢迎，但试管培养仍然可用于检测低浓度的病毒或者慢生长的型别，特别是 A 和 D 种病毒可能要培养 3～4 周的时间。在日常诊断工作中，将试管保留 2 周是非常普遍的。如果试管要保存更长时间，细胞至少需要传代一次以保证单层细胞的活力。典型的腺病毒细胞病变效应(cytopathic effect，CPE)包括肿胀的折光性增强细胞形成葡萄串样聚集(图 106-4b)。腺病毒 D 种感染一般不引起细胞聚集，而在血清型 3 和 7 感染中，可见网状扁平状细胞改变[95]。A549 细胞的细胞病变效应通常在 2～7 天内出现，但其他细胞系的细胞病变效应常不典型，而且进展较慢。随着感染的发展，细胞变得高度颗粒化，并且完全从试管表面脱离。大多数病毒存在于细胞内，因此将收获的细胞反复冻融能得到高滴度的病毒。接种高浓度病毒液数小时内发生的细胞病变效应，被称为“自外裂解(lysis from without)”或“早期细胞病变效应”，是由接种液中病毒游离的五邻体基质蛋白所导致的毒性效应。改用低浓度的病毒接种液可避免这种类型的细胞病变效应产生。

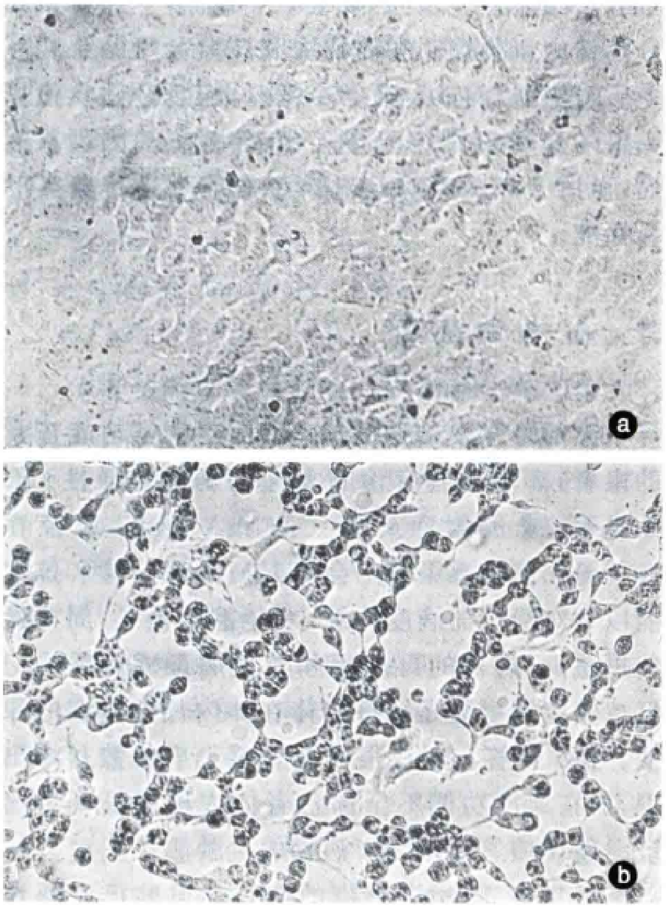


图 106-4 A549 细胞的腺病毒细胞病变效应

注：a. 未感染的细胞；b. 感染晚期的腺病毒细胞病变效应；放大倍数，×100

待测标本接种于 A549 和 Hep2 细胞并经壳瓶离心培养，在接种 1～5 天后可检出很大比例的阳性培养物，还需要使用荧光标记的腺病毒六邻体蛋白的单克隆抗体对培养结果进行验证。通常这类被用来直接检测标本中的病毒抗原的单克隆抗体，也可被用于鉴定壳瓶离心培养的产物。要达到免疫荧光检测的最大效力需要对标本进行至少 30 min 的 700×*g* 离心[20]。在这些条件下，壳瓶离心培养法的敏感性在培养 24 h 时约为试管法的 50%，2 天后能有一定程度的提高，而第 5 天能接近 100%[67,96-99]。使用 24 孔板进行培养也能得到类似的结果。有报道称使用人成纤维细胞或猴细胞的检出率较低[100]。地塞米松能提高壳瓶离心培养对某些病毒的检出率，但是对腺病毒无作用[101]。利用一种由 A549 和水貂肺细胞组成的混合细胞 R-Mix(Diagnostic Hybrids Inc.，Athens，OH)对呼吸道来源的腺病毒进行分离培养的分离率要低于副流感和流感病毒的分离率[102]。如果选择合适的细胞系，可利用壳瓶离心培养检测肠道腺病毒[103]，但也有更灵敏、更便捷的其他检测方法。

八、病毒鉴定

在报告生成前应该对培养的病毒分离株做最后鉴定。在诊断工作中，通常只鉴定到属-特异的水平就足够了。对于腺病毒的直接检测，大部分的免疫学或分子生物学的方法都能满足这个要求。因为免疫荧光法操作简单、快速，所以在培养分离株的鉴定工作中，该方法最常使用。在免疫荧光检测中，当有大于 20% 的单层细胞发生病变效应时，就应该收集那些看起来已被腺病毒感染的细胞进行鉴定。其他鉴定方法包括乳胶凝集、层析法或 PCR。有时会出现不能被现有方法鉴定的细胞病变效应阳性的病毒突变株或新型别，在这种情况下，感染细胞电子显微镜检测或基于 DNA 序列的方法都可能有助于我们对这些病毒株的鉴定。

九、病毒分型系统

将腺病毒鉴定到具体的种或型主要是用来进行流行病学或发病机制研究，以及用来揭示少见或尤为严重感染的病因。传统分型及分子生物学分型的方法均可使用。前者需要分离病毒，并对纤突和六邻体表位的血清学差异进行检测。分子分型法可用于对分离株或直接对 PCR 阳性的标本进行分析。病毒的血清学和分子生物学分型结果基本与血清型分型一致，但当许多新基因型出现时会出现矛盾结果。如果它们与旧血清型存在相同的中和表位，则需要使用分子分型方法。

分子生物学分型法正在逐渐取代血清学法作为常规的毒株分型和流行病学研究的方法。基于序列的分型法快速而准确。使用通用 PCR 或多重 PCR，有时使用巢式 PCR 进行扩增，能获得测序所需的足够的 DNA，则可以直接使用临床标本进行这些检测[104]。其他替代的分析方法包括扩增产物长度的检测、限制性内切酶分析(REA)、限制性内切酶酶切后的测序或质谱分析[79,105-107]，或基于探针技术的分析方法如反向线性印迹法、孔内杂交法、型或种特异性实时 PCR 和固相芯片

法[108-110]。大多数这些替代方法无法鉴别所有腺病毒型别或仅分型到种的水平，而核酸测序方法则更为全面[86,104,111]。长的核酸重复序列（微卫星序列）的多态性分析被建议用于追踪毒株谱系[112]。六邻体基因1～6或7的高变区（编码主要中和表位ε）测序与利用中和试验（“推定血清学”）的经典血清分型所得结果相同[104,113-114]。然而，通过六邻体基因测序无法鉴定与其他型别共享中和表位的基因型，可能需要对纤突基因和五邻体基因进行额外的测序[115]。如果发现与六邻体基因序列的分型结果存在异常相关的疾病，则建议使用上述方法，甚至进行整个基因组测序，因为怀疑可能存在已经发现的基因型或新的基因型[4,6,116-117]。

通过下一代测序方法对完整的腺病毒基因组进行测序是鉴定多种重组基因型，鉴定新基因型，以及有时追溯感染链和流行病学调查所必需的[7,23-24,117-119]。可以从完整的基因组测序中推导出所有其他方法（限制性内切酶分析、六邻体基因部分测序）的结果，因此其可以作为分子分型的参考方法。

限制性内切酶分析无需进行腺病毒DNA PCR扩增[120]，仅需要高度阳性的标本或培养分离毒株，而对酶切类型的解释可能具有挑战性，有时甚至会产生误导[23-24]。然而，除了经典的血清分型法之外，限制性内切酶分析仍用于与严重疾病相关毒株的新基因组型（勿与基因型混淆）的鉴定工作。单链构象多态性和异源双链体迁移检测属于其他直接分型方法。

传统的分型通过血凝试验暂且将分离毒株鉴定到“种”（表106-1），或者当毒株分离自粪便时，利用F种（血清型40/41）特异的酶免疫检测来进行鉴定。随后使用该“种”当中的型特异性抗血清来进行血凝抑制或者血清中和试验鉴定血清型。虽然血凝抑制试验操作更简单，但血清中和试验是最权威的血清型分型的方法。然而，对于新基因型，该方法可能会产生误导性的结果。因为传统分型法需要对上皮细胞（粪便分离株使用293细胞）进行7天的培养，而与之相比，改良血清中和试验具有快速和简单的优势，因而作为首选的分型方法。采用交叉反应抗体的混合血清减少反应的数量。改良血清中和试验包括对分离培养的猴肾细胞进行3天的中和试验和对分离培养的Vero细胞进行5天的微量中和试验[121]。如果某分离株的血凝抑制和血清中和试验分型结果相互矛盾，这在以前被定义为中间型，但现今建议使用完整的基因组测序来鉴定其确切的基因型。然而，血清中和试验仍是对新型血清型进行分类的金标准。

十、血清学试验

大部分原发的腺病毒感染（在免疫功能正常的患者）都伴随着有诊断意义的病毒特异性IgG的升高、或预测意义不大的IgA升高，以及在20%～50%的感染者中会有IgM升高。中和抗体能以相对稳定的滴度持续10年甚至更久，周期性的再感染、病毒的再激活和异型病毒感染后的记忆抗体应答可能是维持抗体在体内长期存在的原因。IgG应答一般在很多儿童感染后的数月才出现，而在免疫功能不全的患者体内可能都不会出现。IgM应答偶尔见于病毒的再激活。

近年来，腺病毒感染的血清学试验已广泛地被其他病毒检测方法所取代。目前，血清学试验主要用于流行病学调查，验证检测到的病毒与异乎寻常的临床结局之间的相关性，以及用于研究病毒的免疫反应。由于血清学转化的回顾性、儿童IgG应答滞后导致的假阴性、IgM检测低敏感性、持续感染的存在及在免疫功能不全的患者缺乏抗体应答等因素的存在，致使血清学试验对患者诊治的价值有限。对异型病毒的抗体应答，以及与近期感染无关的患儿体内抗体迟发升高也可导致假阳性的产生。

血清学试验通常需记录病毒特异性IgG升高至少4倍（血清学转化），或检测到正确临床背景下的IgM应答。对临床而言，明确腺病毒引起感染已经足矣，因此，检测六邻体蛋白IgG或IgM的病毒属特异性的酶免疫试验就能满足工作需求。在固相载体预包被病毒抗原或捕获抗体的酶联免疫试剂已经商品化，并且具有较好的敏感性。血清型特异的抗体检测现很少用于诊断，但当发生了聚集性感染的病例而不能获取其他标本时，该检测能查明引起感染的病毒血清型。血凝抑制和血清中和试验是进行血清型特异性鉴定的首选。血清中和试验是血清学试验的标准方法，首选猴肾细胞进行3天的中和试验或微量中和试验，该

试验可能需要在使用腺病毒载体进行基因治疗的研究开始之前进行。补体结合试验、间接免疫荧光测定、胶乳凝集和放射免疫测定很少用到。利用基因改良细胞和荧光报告分子的检测逐渐取代了血清中和试验被用于血清学调查[122]。

十一、治疗和预防

免疫功能正常患者的大多数腺病毒感染为轻度且是自限性的，无须抗病毒治疗，但其引起的严重下呼吸道疾病可能很严重甚至致命。如果可行的话，减轻免疫抑制疗法对免疫抑制的患者至关重要，因为腺病毒感染的严重表现显然与免疫抑制有关，如播散性疾病。

部分抗病毒药，包括更昔洛韦（ganciclovir）、利巴韦林（ribavirin）和无环核苷磷酸酯类似物的广谱抗病毒药西多福韦（cidofovir），以及抗逆转录病毒药扎西他滨（zakitabine）、阿洛夫定（alovudine）、司他夫定（stavudine），在体外均有抗腺病毒活性。利巴韦林最初被报道仅对腺病毒C种型别有体外抗病毒活性，但现在认为其对大部分A、B、D种和全部C种的分离株均有效[123]。所有型别腺病毒在体外均对西多福韦敏感，包括与严重的下呼吸道感染相关的新发14p1型腺病毒，而该型对利巴韦林却不敏感[124]。虽然病毒在体外连续传代会产生耐药，但到目前为止，几乎没有从西多福韦治疗的患者体内分离出过耐药毒株[123]。

西多福韦被广泛应用于治疗多种临床症状，其主要的治疗对象为免疫功能不全的患者。尽管存在严重的不良反应（肾毒性、骨髓抑制和葡萄膜炎），其毒性在可接受水平的治疗方案已被明确[125]。相关前瞻性对照临床试验尚无报道，但有回顾性研究报道，西多福韦应用在造血干细胞移植患者的疗效高达98%，且死亡率与以前的研究相比也有所减少[33,125]。然而，也报道了一些治疗失败的案例，这些可能与治疗起步较晚有关，此时患者出现感染症状，并且外周血液中存在高载量病毒（$>1\times10^6$ 拷贝/ml）[94,126]。因此，欧洲白血病感染会议指南推荐高风险患者（定义方式基于宿主因素、移植类型和病毒血症——通常为定量PCR检测的DNA血症）预防性使用西多福韦[29]。建议高危患者在移植后的最初几个月应每周监测DNA血症，以便在病毒检测阳性或者载量升高时进行西多福韦先发治疗。这项举措仍不能完全消除腺病毒感染性疾病，然而，一些没有经过治疗的患儿能自发地清除病毒DNA血症[125]。由于低病毒载量对造血干细胞移植患者的死亡率并不产生影响，有讨论建议使用病毒载量阈值（如 1×10^4 拷贝/ml）来启动西多福韦治疗，以避免过度治疗和不必要的不良反应[29,33,93]。然而，由于没有国际标准，不同实验室之间腺病毒载量的定量值可能存在显着差异。通过额外的每周监测粪便标本来定量检测腺病毒排毒（$>10^6$ 拷贝/ml），有助于早期发现存在严重病毒DNA血症的高风险患者[33,46,127]。但是，仅检测HAdV-F种40和41型的胃肠道PCR组合测试卡不适用于上述监测，因为检测HAdV-A、B和C种的排毒是必不可少的，这是由于上述腺病毒（A、B和C）种而非HAdV-F种，与造血干细胞移植患者的高死亡率相关[31]。用于呼吸道病毒检测的高度多重PCR组合测试卡同样不适用，因为它们可能无法检出非呼吸道腺病毒种（如A种）的型别（如31型），这是造血干细胞移植患者的重要病原体[85]。

一种用脂质体包被西多福韦的药物——博瑞西多福韦[brincidofovir，CMX001；十六烷丙氧基西多福韦（hexadecyloxypropylcidifovir）]在治疗腺病毒感染的早期研究中被证实有效[128]。博瑞西多福韦可口服，吸收好，细胞内浓度高于西多福韦，毒性较小。有体外试验证据表明其对一系列双链DNA病毒均有抗病毒活性，且毒性较西多福韦低[129]。在一项多中心回顾性研究中，比较了造血干细胞移植患者使用博瑞西多福韦和西多福韦预防性治疗的情况，发现使用博瑞西多福韦患者的病毒学应答更为明显[130]。腹泻是博瑞西多福韦的主要不良反应。一项关于博瑞西多福韦用于存在无症状HAdV DNA血症的造血干细胞移植患者预防性治疗的随机安慰剂对照临床试验证实，其对试验主要终点没有显著影响；主要终点定义为经历治疗失败的，或进展为可能或明确腺病毒疾病或明确加重的腺病毒DNA血症的受试者比例[131]。但是，博瑞西多福韦100 mg（体重<50 kg为2 mg/kg），每周2次给药者可观察到阳性趋势，而200 mg每周单次给药者未见阳性趋势。也许是由于该研究为3组设计，各组的样本数不够造成研究力度不够。

更昔洛韦在体内仅发挥适度效应，不再被推

荐于临床应用。利巴韦林的应用成功一些，但是也有许多无效和死亡的报道[28]。利巴韦林对出血性膀胱炎可能有一定的疗效，这可能与尿里的药物浓度高有关。

免疫疗法是另一种前景不错的治疗策略，包括应用供体的淋巴细胞输注或腺病毒特异性细胞毒性 T 淋巴细胞的过继转移[132-133]。在一些研究中 2 种方法无论是否联合抗病毒治疗，都能改善造血干细胞移植患者的预后。为避免供体淋巴细胞输注造成的移植物抗宿主病，腺病毒特异的细胞毒淋巴细胞在体外制备。一项在体外扩增天然脐带血 T 细胞用于治疗腺病毒、EB 病毒和巨细胞病毒感染的策略展现了曙光[134]。

一种针对 HAdV 4 型和 7 型的疫苗可以预防呼吸道感染，新兵呼吸道感染甚至可能表现为急性呼吸窘迫综合征(表 106-2)。该疫苗由非减毒活病毒组成，制成肠溶衣片剂。该型别病毒引起的肠道感染会诱导免疫力形成，继而预防该型病毒随后导致的呼吸道感染。这种疫苗在年轻人和健康的成年人中是安全且高效的[135]，并且还减少了军事基地建筑物表面的 HAdV 污染[136]。然而，这种疫苗仅向美国军方供应，对于严重呼吸道感染高风险的人群(如免疫抑制的患者)疫苗的安全性受到质疑。

十二、结果的评价、解释和报告

腺病毒所致临床疾病谱非常广泛，因此实验室检测对于精确诊断十分重要。实验室检查方法的选择需要参考患者症状和免疫状态，标本采集与发病的间隔时间，以及实验室技术水平等因素。在过去几年里，分子生物学检测已经占据主导，全自动“标本入、结果出”检测系统应用使得大部分腺病毒感染可以在数小时内检出，并且实验室自行研发的定量分析可以在 1～2 天内完成检测。腺病毒分离培养方法(离心或试管培养法)的使用持续减少。抗原检测的临床应用有限，血清学试验很少能够提供给临床可操作的数据。各种检查旨在系统检测血液样本(主要针对免疫功能不全患者)或者检测终末器官的受累情况。在后一种情况下，组织病理学和辅以免疫组织化学及原位杂交技术具有重要诊断价值。

由于很多腺病毒感染的无症状性及腺病毒感染潜伏等因素的影响，对于阳性结果解释具有挑战性。结果的准确解读需要考虑患者及标本情况、检测方法，以及在某些情况下病毒型别和检测到的载量[137]。这就需要实验室和临床医生之间的密切沟通。一般情况下，从受累器官检出病毒，或在患有与腺病毒流行病学相关疾病的患者检出大量病毒，可以证明腺病毒是致病的真正原因。

目前在腺病毒呼吸道感染快速检测中，基于 PCR 的方法学已经取代了病毒分离培养及抗原检测方法，这类检测通常敏感性高。儿童样本可以获得更高的检出率，这是由于患儿相比成人通常排出的病毒滴度更高且排毒持续时间更久。上述情况也可见于近期另一种呼吸道病原体引起的临床相关感染。由于腺病毒在种系发生过程中的复杂性使检测试验的设计分析具有难度，因此试验方法的选择必须要慎重。如一个试验声称具备非常广泛的检测能力，可能针对某些特定型或种的腺病毒的敏感性却显著降低。尽管如此，随着时间的推移，腺病毒检测的敏感性和快速性已显著提高，这类检测结果的快速报告对患者和财政都有好处[138-139]。PCR 敏感性较其他方法具有的优势在于其应被考虑作为其他检测方法为阴性的危重或高危人群样本检测的确证性反映测试。尽管病毒 DNA 血症评估通常用于免疫功能不全患者的诊断，它也可以是针对免疫功能正常儿童严重腺病毒疾病的有效辅助诊断[76]。然而，PCR 检测的极高敏感性也带来质疑，如无症状受试者标本筛查可检出低水平病毒载量。当缺少免疫组织化学或原位杂交方法检出相关病毒包涵体的结果时，组织的 PCR 检测结果可能特别难以解释；此外，症状消失后腺病毒持续排毒的临床意义仍然是一个悬而未决的问题[137]。

相比之下，采用酶联免疫测定、免疫层析法、分离培养或 PCR 方法检测眼部腺病毒被认为可能具有诊断意义。尽管脑脊液 PCR 可能是腺病毒性脑炎和脑膜炎的首选检测方法，但其发生率较低而缺乏针对传统检测方法和新方法的对比研究。

针对粪便的 40/41 型特异性免疫检测或胃肠道 PCR 组合测试卡检测是针对免疫功能正常患者腺病毒胃肠炎最好的检测方法。结果解释一般都非常明确，因为这些患者在有症状期过后极少有病毒排出。相反，在免疫功能正常的无症状患

者和免疫功能不全患者的粪便中可长时间检出非肠道腺病毒。腺病毒可能会引起免疫功能不全患者发生严重的胃肠道疾病，而粪便中检出病毒可能预示致命性播散性感染的发生。在异体干细胞移植受者粪便中超过 10^6 拷贝/ml 的高病毒载量预示着随后可能发生病毒 DNA 血症。免疫功能不全患者粪便的非肠道腺病毒检测和定量可通过通用实时 PCR 完成，而只针对肠道腺病毒（40/41 型）的胃肠道 PCR 组合测试卡无法完成该检测。移植受者粪便的腺病毒检测并不能排除移植物抗宿主病。

已确认尿中检出腺病毒与出血性膀胱炎有关，在免疫功能正常患者中通常见于儿童，以男孩居多，并且与腺病毒 11、34 和 35 型关系密切。在造血干细胞移植患者中，出血性膀胱炎可能非常严重，并且可能是严重疾病或播散性疾病的初始发病部位[48]。然而，和在其他系统器官中一样，腺病毒可从尿中排出且无任何症状，这类标本行常规检测的预测值是未知的，一些研究者尚未发现造血干细胞移植患者中腺病毒尿症与出血性膀胱炎之间的相关性。

对于免疫功能不全患者而言，腺病毒疾病诊断充满挑战，原因在于这类人群可能存在多种病原体的混合感染，无症状的病毒排出率高及复杂多变的腺病毒感染的临床表现。造血干细胞移植和实体器官移植受者发生严重疾病的风险最高，同时也是检测的常规重点人群。一些医学中心采用监测性的病毒分离培养或 PCR 方法来研究身体多个部位与当下新发临床症状相关的病毒检测。然后根据病毒阳性部位的数量、症状或组织学确证将疾病累及程度分为“感染、可能患病或确诊患病”3 类。作为替代手段，采用定量 PCR 方法进行腺病毒 DNA 血症的检测逐渐广泛使用。尽管不是所有 PCR 阳性患者都会出现症状，严重或致死性腺病毒感染期间常发生病毒 DNA 血症，并且先于疾病的发生。治疗成功后病毒的检测值也会明显下降。因此，现在许多移植中心对高危移植患者每周进行病毒 DNA 血症定量监测，依据单次的强阳性或从低的基线水平大幅度增高的结果进行预防性治疗，并通过对病毒 DNA 血症的再次评估来判断治疗效果。类似的方法可用于评估腺病毒疾病新治疗方案的临床效果。然而，在采用通用或共识的“节点”而开始治疗时应该谨慎。每一种检测由于国际定量标准的缺乏、方法学间的较大差异及不同病毒型别间潜在的定量误差，意味着治疗阈值必须根据各个机构中使用的检测方法和待测人群而不断进行验证。

参考文献请扫二维码查阅

第107章　人乳头瘤病毒

KATE CUSCHIERI, ELIZABETH R. UNGER

（张蕴莉　译；戴二黑、钱渊　审校）

一、分类学

乳头瘤病毒(papillomaviruses, PVs)属于乳头瘤病毒科(Papillomaviridae)。PVs 病毒颗粒无包膜，直径约为 55 nm，由环状双链 DNA 基因组(约有 8000 个碱基)和包含 72 个衣壳蛋白的正二十面体衣壳结构组成。基因组分成具有上游(非编码)调节区的早期基因和晚期基因。两个晚期基因编码衣壳结构蛋白(L1，主要；L2，次要)。根据 L1 可读框(open reading frame, ORF)的核酸序列进行 PVs 系统分类。国际病毒分类委员会(The International Committee on Taxenomy of Viruses, ICTV)根据核酸序列同源性将乳头瘤病毒分为 49 个属，每个属均用希腊字母(例如，*Alphapapillomavirus*，*Betapapillomavirus*)表示。在其中的 5 个属发现了感染人类的人乳头瘤病毒(human papillomaviruses, HPV)(图 107-1)。用有数字的属名称(例如，α 乳头瘤病毒 9)表示一个“种”(species)，并且在种内将“毒株”指定为型别，并按其被识别的前后顺序编号，特别是在流行病学和临床背景下，HPV 通常是在“型”或“基因型”水平上进行描述。新型别的认证需要完整的基因组序列，并且 L1 ORF 序列与最接近的已知的型别相比有大于 10%的不同；序列变化小于 10%可以认同是同一个型别，但目前系统命名法尚未达成共识。通常将 10% 和 2%之间的差异称为亚型，将小于 2%的差异称为变异株。当前，已认证出 200 多种 HPV 型。在卡罗林斯卡研究所(Karolinska Institute)的国际 HPV 参考中心确认新型别的序列并对 HPV 型别进行编号。乳头瘤病毒分析库(The Papillomavirus Episteme, PaVE)是 PV 基因组序列和序列分析工具的精选数据库[1]。

二、病原体群的描述

PVs 是一个大的密切相关的科，具有严格的宿主种特异性，并且严格地感染上皮表面。在宿主细胞核中复制，复制和转录均依赖于宿主细胞相应过程。早期蛋白和晚期蛋白通过不同的启动子仅从一条链沿一个方向发生转录。蛋白质的 ORF 序列常发生重叠，转录调控十分复杂，并通过目前知之甚少的多顺反子信使加工和拼接过程进行调控。当完全分化的细胞从上皮表面脱落时，有效的病毒感染即完成；因此，感染是非细胞溶解性的。仅感染上皮细胞、无宿主细胞坏死使病毒易于逃避宿主免疫反应。众所周知，HPV 都需要终末上皮细胞分化才能完成病毒生命周期，因此常规的细胞培养方法不能用于分离或培养 HPV(请参阅参考文献[1]和[2]中有关 HPV 生物学的综述)。

因所有 HPV 都具有某些同源性(图 107-2*)，以 HPV 16 的基因组结构为例，非编码上游调节区(也称为长控制区)包括细胞转录因子结合位点及调节复制和基因表达的病毒蛋白的结合位点。核心基因(*E*1、*E*2、*E*4、*E*5、*L*1、*L*2)在所有 HPV 类型的基因组复制和包装中均具有重要功能。E1 是复制必不可少的启始识别蛋白，E2 与 E1 相互作用以增强E1结合的特异性，并对其他早期蛋

*译者注：原著引用其他著作图，未经原作者授权翻译，故此保留原图

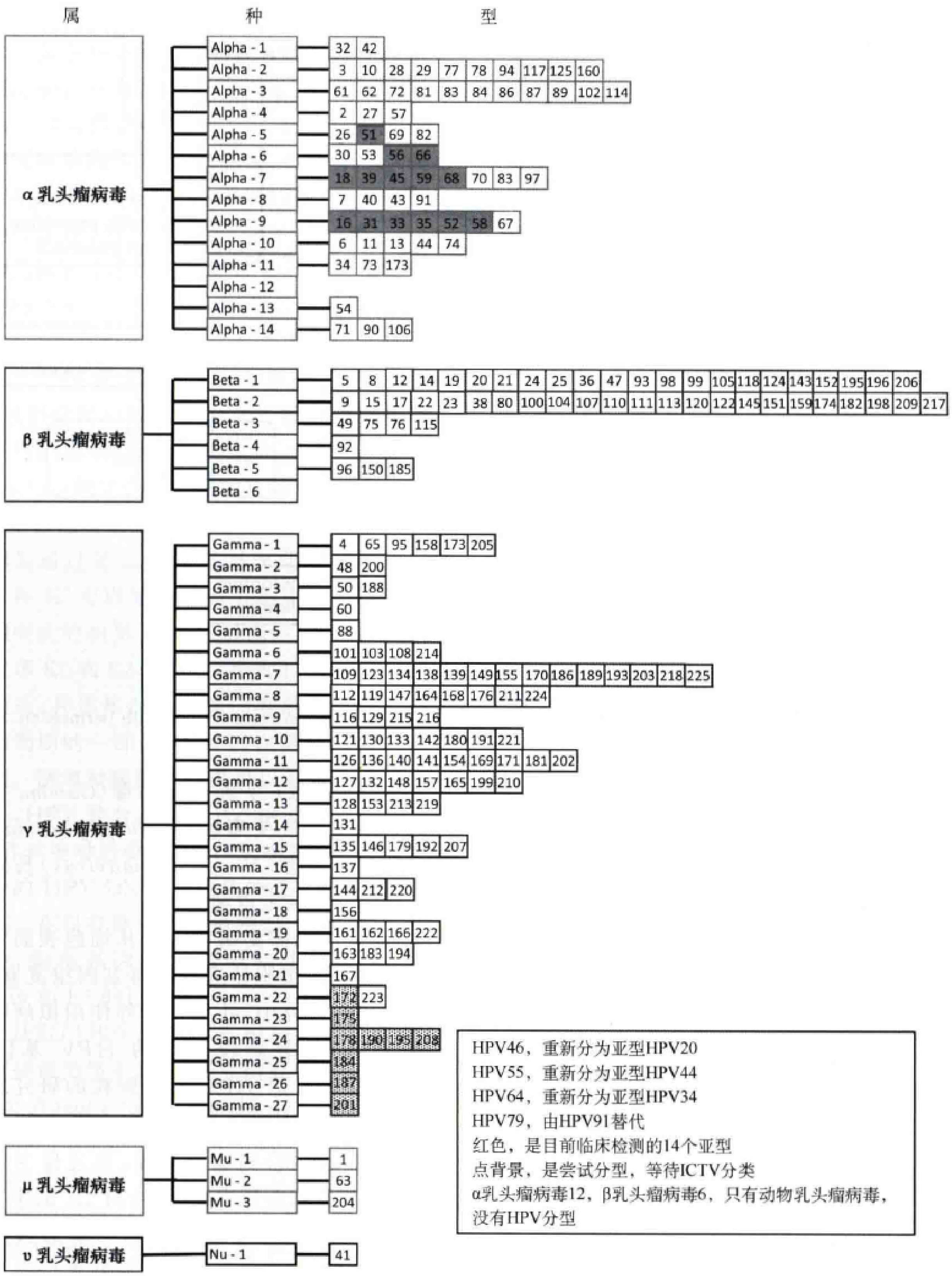


图 107-1　基于 L1 基因核苷酸序列的乳头瘤病毒(Papillomaviridae)科，只包括 HPV。α 乳头瘤病毒属下的种包括了特异性感染皮肤和黏膜上皮的 HPV 型。在生殖器癌前和癌症中发现的黏膜高风险型(红色阴影)属于该属，在生殖器疣、复发性呼吸道乳头状瘤病和局灶性上皮增生中发现的低风险型也属于该属。该属的皮肤型与良性普通疣、扁平疣、足底疣和丝状疣有关。手疣特别常见，通常靠近指甲。另一个属包括嗜皮肤上皮性的 HPV 型别。β 乳头瘤病毒属中的种感染通常是亚临床的，但在患有免疫缺陷(如疣状表皮发育不良或免疫抑制)的患者中引起皮肤损害。已证实其与疣状表皮增生症患者，特别是与阳光有关的非黑色素瘤皮肤癌有关。γ 乳头瘤病毒、μ 乳头瘤病毒和 ν 乳头瘤病毒属中的种中 HPV 型别通常是亚临床的，但与皮肤病变有关，最明显的是手足疣中的 HPV 1 和 63 型 μ 乳头瘤病毒。在癌症中尚未发现过 μ 乳头瘤病毒，而在皮肤癌中偶有发现 γ 和 ν 乳头瘤病毒的一些型别，见彩插

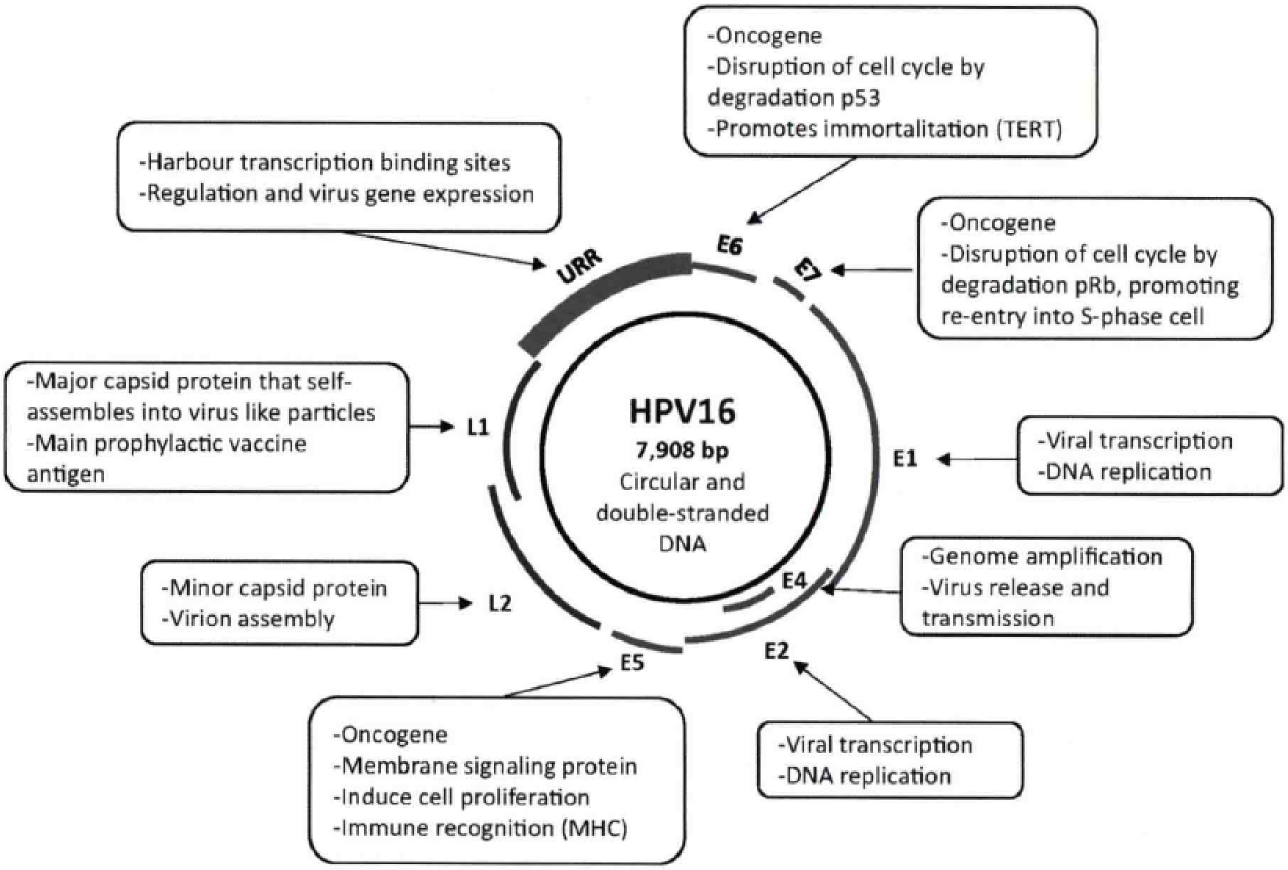


图 107-2 Genomic organization of HPV as exemplified by HPV 16. From reference 78, with permission.

白质的调控产生关键影响，E4 在病毒生命周期的后期发挥作用，与细胞角蛋白结合，并在细胞脱落时帮助破坏细胞结构并释放病毒颗粒。主要衣壳蛋白 L1 通常形成五聚体衣壳，组装成病毒蛋白核衣壳。在体外当蛋白质表达系统中出现 L1 时，重组 L1 蛋白会自组装成病毒样颗粒（viral-like particles，VLP），该颗粒保留型特异性中和表位（type-specific neutralizing epitopes），在电子显微镜下具有与天然病毒颗粒非常相似的形态，次要衣壳蛋白 L2 在病毒基因组装入衣壳和感染过程中的病毒脱衣壳中起着关键作用，它还可能促进病毒进入细胞。

其他基因（*E5*、*E6*、*E7*）对于复制和生命周期的完成也是必不可少的，但是它们的性能在不同属之间不同，并且在 α 乳头瘤病毒属中，在不同的种（species）之间也会有所不同。*E5*、*E6* 和 *E7* 的特性会影响病毒的持续感染、转变为生命周期的失控或停止，以及致癌作用的倾向（请参见下文有关临床意义的部分）。这些蛋白质的功能也影响各类型病毒的特定上皮环境特征。例如，α 乳头瘤病毒易感染非角质化黏膜，而 β 乳头瘤病毒（*Beta papillomavirus*）、γ 乳头瘤病毒（*Gamma papillomavirus*）、μ 乳头瘤病毒（*Mu papillomavirus*）和 ν 乳头瘤病毒（*Nu papillomavirus*）易感染角质化细胞和皮肤上皮细胞。

HPV 感染需要病毒颗粒从细胞表面穿过细胞质（浆）到达细胞核进行病毒基因组复制，其详细过程仍在研究中，并且在体外使用拟病毒颗粒的研究（即包装质粒表达的 *HPV* 基因组的 VLP）与体内天然 HPV 病毒颗粒的研究之间有所不同。当前模型[3]是体内病毒颗粒结合到基底膜上，然后结合到细胞表面，该过程主要是通过 L1 相互作用介导完成的，针对 L1 的中和抗体可以阻止这种结合。尽管结合可能通过多种细胞外基质蛋白发生，但硫酸乙酰肝素似乎是转移至细胞表面所必需的物质。共受体可能参与结合和入侵过程，涉及使 L2 暴露于弗林蛋白酶裂解的病毒蛋白表面的构象变化，该步骤是必不可少的，因为针对 L2 的抗体会阻止病毒入侵[4]。病毒通过一个缓慢的超过数小时的内吞作用进入细胞。

HPV 感染始发于基底样上皮细胞，可通过微

小创伤或在上皮转变的特殊部位进入。许多感染是完全无症状的，活动性感染通常导致被感染的基底细胞和正在分化的细胞扩散，形成疣或乳头状瘤。大多数感染都是一过性的、自发清除的或者已经无法检测到(是潜伏的)。在动物 PVs 基底上皮细胞的潜伏感染已有详细的记载，怀疑这种情况也发生在人类[5]。

未清除的 HPV 感染病毒可能会以活动性或潜伏性感染的形式持续存在，并且有些型别(请参阅下文)可能最终参与了肿瘤的发生。癌症的发生和发展之间的间隔时间通常很长，至少 10 年。HPV 致癌途径可以被认为是一种非活动性感染或不成功的感染(流产感染)，即不产生子病毒的感染，这与其他导致癌症的病毒是一致的[5-7]。E6 和 E7 蛋白是病毒启动复制过程所必需的，这个启动过程是通过延长细胞复制周期来实现的。因此，E6 和 E7 可以导致基因组不稳定和增殖细胞内细胞突变的积累。HPV 可能发生整合，最常见的是破坏 E1 和 E2 的表达，导致 E6 和 E7 的进一步过表达，并逐步促进肿瘤的发展。整合不是正常生命周期的一部分，但可以在某些癌前病变中检测到。游离型病毒基因组可以整合为单拷贝或多拷贝，HPV 整合在与 HPV 相关的癌症中很常见，但并非绝对必要。与 HPV 相关的癌症可能具有整合的 HPV DNA、染色体外游离型 HPV 或两者皆有。在只有染色体外游离型 HPV 的大多数癌症中，病毒基因组已被甲基化或突变，导致 HPV E6 和 E7 的过表达。

在从肛门和生殖道样本中检测到的 40 种 α 乳头瘤病毒类型中，国际癌症研究机构(the International Agency for Research on Cancer，IARC)已根据其与癌症的关系将其中的 12 个 HPV 型指定为致癌或高危[8]。迄今为止，在所有临床 HPV 检测中检测到的 14 种高危型(直接或通过交叉反应)包括 IARC 认为致癌的 12 种类型(HPV 16、18、31、33、35、39、45、51、52、56、58 和 59)，IARC 认为可能致癌的另一种类型(HPV 68)和以前认为致癌的类型(HPV 66)现在都被认为可能致癌。这些高风险型是 α 乳头瘤病毒的型，主要存在于 α-9 和 α-7 种(图 107-1)。一些 β 乳头瘤病毒被认为与紫外线相互作用会导致非黑素瘤皮肤癌，但是生物学原理尚不十分清楚[9]。目前，除 α 乳头瘤病毒的型别外，尚无理由或适应证对其他型的乳头瘤病毒做临床检测。

不足一半的被感染者发生宿主抗体反应，缺乏一致性的体液免疫反应解释了为什么需要依靠基因组差异来进行分类(即 HPV 基因型而非血清型)，也解释了血清学在既往自然感染史研究中的局限性和 HPV 血清学在诊断检测中的不恰当性。已经检测到针对多种多样的 HPV 蛋白质的血清抗体，但对于 L1 VLPs 中型特异性构象表位的抗体已经做了很多研究，是针对自然感染和 HPV 疫苗而开展的。动物和体外系统证明，这些抗体具有中和作用，即可以防止感染[10]。女性对自然感染的免疫反应强于男性，有证据表明，女性对型特异性再感染有适度的保护作用，但男性没有[11]。男性和女性对 HPV 疫苗的免疫反应强度相同[12]。

三、流行病学和传播

HPV 具有严格的种特异性，无动物宿主或媒介。在大多数情况下，传播需要紧密上皮接触。生殖器和非生殖器感染的流行病学和传播方式明显不同，在儿童和青少年中最为常见的手、足疣属于非生殖器感染，通过直接接触传播，尽管环境传播也有提示，是由那些赤脚在游泳池或淋浴区行走的人和患有手疣作为屠夫和肉类加工人员的职业风险而增加的(见下文皮肤疣部分)。

生殖器或黏膜 HPV 的流行病学和自然史因解剖部位、性别和年龄而异[13]。此外，取样和分析方法(在后续章节中讨论)也会影响研究结果。总的来说，性接触(不仅限于插入性的性行为)是主要的传播方式，其发病率和患病率与首次性交年龄和性伴侣的数量密切相关。HPV 是最常见的性传播病毒，据估计，几乎每个性活跃成年人一生中都会发生感染。垂直传播和非性传播途径很少见，但是在出生后前 2 年内可能会发生，前者被认为是幼年型复发性呼吸道乳头瘤的发病机制(请参见下文的“临床意义”)。由于病毒的稳定性，认为胎儿传播是可能的，但非性途径传播的频率和可能性尚不清楚[14]。

子宫颈 HPV 感染的自然史已得到最深入的研究。子宫颈癌是第一个与 HPV 相关的恶性肿瘤[15]。基于子宫颈脱落细胞学(Pap 试验)的子宫颈癌筛查有助于更好地了解子宫颈癌的进展，确

立了在移行带或者鳞-柱状上皮交界处取样的重要性，并为在相对可及的子宫颈取样提供了可靠的方法。现已明确，子宫颈 HPV 通常是在首次性行为时感染的，并且人群流行的高峰期是在青春期晚期/成年初期(图 107-3*)。生成肿瘤需要感染一种致癌型别，但是并不足以促进肿瘤进展，高级别宫颈癌前病变的高峰人群患病率出现在 HPV 感染后 5～10 年，这表明需要存在持续感染，以及其他行为和环境因素刺激，如吸烟、慢性炎症。

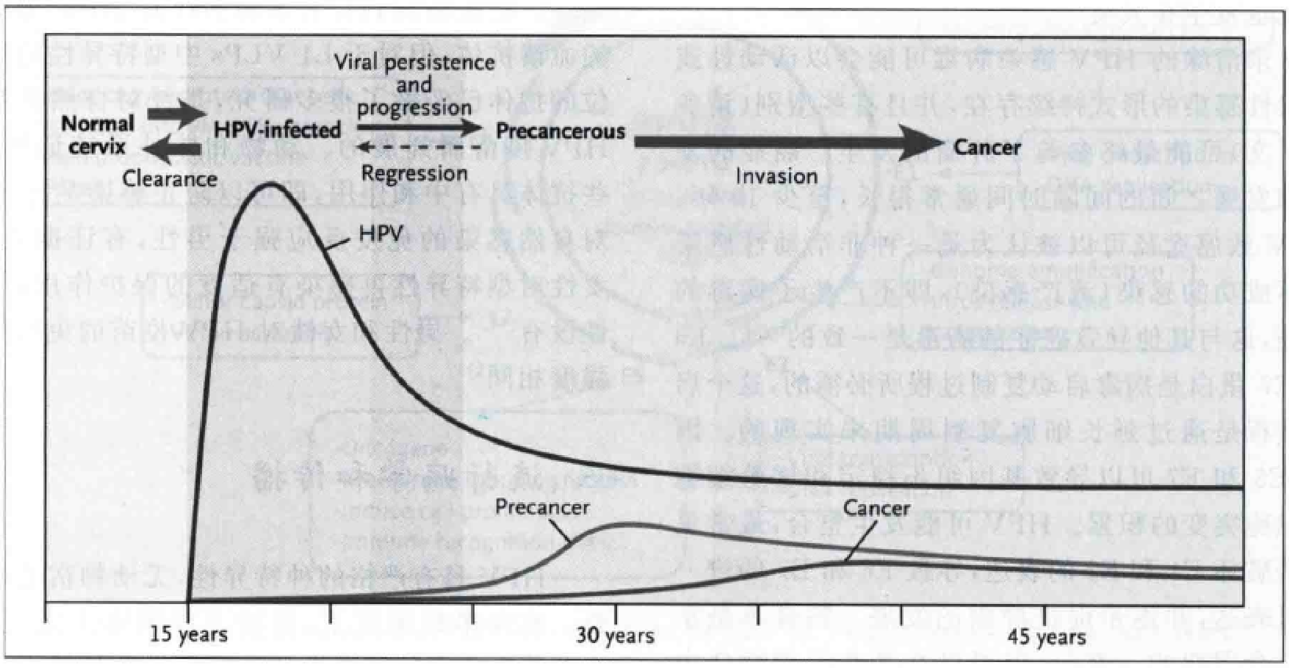


图 107-3 The natural history of cervical HPV. The peak prevalence of transient infections with highrisk types of HPV(blue line) occurs among women during their teens and 20s, after the initiation of sexual activity. The peak prevalence of cervical precancerous conditions occurs approximately 10 years later(green line), and the peak prevalence of invasive cancers occurs at 40 to 50 years of age(red line). (The peaks of the curves are not drawn to scale.) From reference 79, with permission.

如果癌前病变没有消退，也没有被发现和移除，那么随着时间的推移可能发生侵袭，一般是几年。因此，这种罕见的侵袭性癌症在最初感染几十年后(decades)才慢慢出现。

如前所述，大多数 HPV 感染，甚至是致癌型别的 HPV 感染，都是自发清除的。然而，致癌型中的一种 HPV 的持续感染与子宫颈癌的发生风险有关，高危型的 HPV 是子宫颈癌发生所必需的的，但是不足以发生子宫颈癌。子宫颈 HPV 的自然病史总结在图 107-3 中。感染和癌症之间的时间间隔使得用细胞学筛查子宫颈癌成为可能。HPV 可导致子宫颈癌，意味着预防感染可以预防癌症，从而为预防性 HPV 疫苗奠定了基础(请参阅下文有关预防性 HPV 疫苗的部分)。此外，HPV 核酸的检测可以作为子宫颈疾病的风险标志物，作为细胞学的辅助手段或作为主要的筛查实验(请参见下文的基因分型部分)。

四、临床意义

HPV 感染可诱导细胞发生自然程序以外的增殖，这可能会产生亚临床或良性或恶性临床后果。α、β、γ、Mu 和 ν 乳头瘤病毒属中的一些 HPV 型可引起具有临床后果的感染[16]。尽管存在例外情况，结合一组系统发育相关型别的种群通常具有相似的风险/表现，所以临床“表型”无法可靠地被用来预测 HPV 的“种”群。有趣的是，随着测序技术分辨率的进步，证实了即使在变异水平上也

*译者注：原著引用其他著作图，未经原作者授权翻译，故此保留原图

可能存在不同的临床风险和倾向性。例如，HPV 16 的某些变异株更可能与腺体异常相关，并且与核苷酸多态性较多的变异株相比，具有高度 E7 保守性（与典型类型相比）的 HPV 16 变异株预后更差[17]。鉴于大部分临床发病率与 α 乳头瘤病毒属内的一些型别有关，在以下各节中将特别关注这些型别的临床意义。

（一）皮肤疣

皮肤疣是 HPV 感染的最常见表现，估计在一般人群中患病率为 7%～12%。普通疣（寻常疣）通常由 2 型和 4 型 HPV 引起，表现为单个病变或呈簇状，最常见于手上，尤其是在甲床附近。普通疣在儿童时期尤为普遍。从本质上讲，它们是良性病变，无痛仅影响容貌。足底疣（疣状疣）最常见是由 HPV 1 引起的，通俗称之为“疣”，常表现为脚底的过度角化病灶，有痛感，尤其在外力作用下。足底疣与游泳池有关，在游泳池中，潮湿的皮肤更易有轻微磨损，从而使病毒颗粒进入基底上皮。其他类型的皮肤疣包括与咬指甲有关的甲周疣和扁平疣，表现为面部、颈部、手、腕部和膝盖上有多个肉色突起。较罕见的丝状疣为长条形，表现在唇外缘或眼睑边缘。从组织学上讲，疣与真皮全层的肥大和角质层的过度角化有关。在无干预情况下，疣可自行消退，但相关免疫因素尚不清楚，但是常会复发。

（二）肛门生殖器疣

这些疣通常被患者发现，视为可见的花椰菜样生长物，可能呈粉红色、棕褐色或色素沉着，它们可发生在肛门生殖器上皮的任何地方，包括外阴、会阴、阴茎和肛周区域。大多数肛门生殖器疣（anogenital warts，AGWs）由 6 型和 11 型 HPV 引起。AGWs 的管理和治疗是一个重要的临床负担。一项英国的大型评估表明，在向生殖泌尿医学诊所转诊的 100 个病例中，AGWs 占了 16 个[18]。AGWs 的复发很常见，约 50%的患者在清除后的一年内复发，症状包括烧灼感、瘙痒、分泌物和出血。生殖器疣在临床上很容易诊断，因对 HPV 分型不会为管理或治疗决策提供任何依据，所以不建议进行 HPV 测试来排除临床怀疑病例。肛门生殖器疣很少发展成癌症。罕见的 Buschke-Löwenstein 肿瘤（有时也称为 Buschke 和 Löwenstein 巨大尖锐湿疣），是一种进展缓慢的肿瘤，具有局部侵袭性，类似于疣状癌，最常见发生部位在阴茎龟头上，这些病变在男性比女性中更为常见。

（三）免疫功能低下人群的疣

疣在免疫功能低下的人中更常见，包括器官移植受者、孕妇和 HIV 感染者。例如，估计约有 40%的肾移植受者在 1 年内出现皮肤疣。器官移植受者的医源性免疫抑制作用还与皮肤中 β-PVs 的复制增加有关，值得注意的是，移植受者发生光化性角化病和皮肤癌的风险是健康者的 250 倍[19]。罕见的常染色体隐性遗传性皮肤病疣状表皮增生症是一种慢性免疫疾病，导致 HPV 感染的高易感性，至少部分是由于对 HPV 感染细胞的 T 细胞毒性受损所致。手、脸、躯干和四肢出现广泛的扁平疣和乳头状疣是其特征，30%～70%的患者会发生恶性肿瘤，尤其是在阳光照射的皮肤中。疣状表皮增生病变中存在多种 HPV 型别，包括 4 型、5 型、8 型、9 型、12 型和 15 型，多型同时感染常见。

（四）口腔和上呼吸道疣

1. 复发性呼吸道乳头状瘤病（recurrent respiratory papillomatosis，RRP） RRP 是一种罕见疾病，其特征是喉部和上呼吸道其他部位的良性乳头状瘤样病变，对治疗具有典型的抵抗力。发病可能在儿童期（青少年期）或成年期。患者通常表现为声音嘶哑、声音改变或其他气道功能障碍，如慢性气短。根据内镜检查的特征性外观和活检的组织病理学改变可做出 RRP 的明确诊断。几乎所有 RRP 病变均由 HPV 6 型和 11 型引起，HPV 检测在诊断或治疗中没有意义。尽管组织学上表现为良性，但由于经常需要手术、声带可能受到损害及可能发生呼吸道阻塞，使得发病率显著增高。恶性进展很少发生，但已有报道，尤其是在延伸至下呼吸道的病变中[20-21]。

2. 口腔乳头状瘤病 口腔黏膜可能会出现多种良性病变，在颊黏膜上出现呈簇病变被称为口腔菜花样乳头状瘤病。与口腔乳头状瘤相关的 HPV 型别是那些在生殖道中更常见的型。

（五）人乳头瘤病毒和癌症

在全球范围内，每年 570 000 例女性癌症和 60 000 例男性癌症由 HPV 所致，分别占所有癌症

的 8.6%和 0.8%[22]。具有循证 HPV 病因的生殖道肿瘤包括子宫颈癌、外阴癌、阴道癌、肛门癌和阴茎癌,尽管高危 HPV(HR-HPV)驱动的疾病的可归因部分因解剖部位而异(如下所述)。此外,某些口咽鳞状细胞癌(软腭和会厌之间的咽部区域尤其是扁桃体和舌根)与 HR-HPV 有关。生殖器鳞状细胞癌的癌前病变或原位癌阶段,称为上皮内瘤变,组织病理学分级为 1～3 级,其中 3 级表示异常级别最高。鳞状细胞癌前病变的另一个类似于细胞学的术语正在被美国引入:低级别或高级别鳞状上皮内病变[23]。腺性癌前病变比鳞状细胞癌前病变少,被称为原位腺癌而无分级。对于人类乳头状瘤病毒感染的自然史、侵袭前病变和癌的发生,在子宫颈了解得最充分,这为全面筛查提供了信息。其他肛门生殖器癌的自然病程知之甚少,并且不能可靠地检测到口咽癌的侵袭前阶段。

1. 子宫颈癌和癌前病变 子宫颈癌是最常见的 HPV 引发的癌症,每年约有 53 万例[22]。大约 80%的癌症发生在低收入和中等收入国家,在这些国家,很少有机会选择疫苗接种和筛查提供一级和二级预防策略和治疗。子宫颈癌最常见的组织学类型是鳞状细胞癌,发生在鳞状或化生上皮中(70%～75%),腺癌较少(约 20%),其他罕见类型约占子宫颈癌的 5%。持续感染 HR-HPV 是子宫颈癌进展的主要危险因素,约 95%的子宫颈癌 HR-HPV 阳性,其中 HPV 16 和 HPV 18 占 70%。对子宫颈癌中 HR-HPV 缺失的解释包括检测高度片段化的病毒基因组和(或)"肇事逃逸"理论的技术挑战,在某些肿瘤中,病毒在病变发展的早期阶段表现出恶性表型,但不再存在于癌症中。当然,有一些罕见的子宫颈组织学亚型(如透明细胞腺癌)与 HPV 的低发病率有关(<30%)[24]。对于浸润前病变(preinvasive lesions),子宫颈上皮内瘤样变 1(cervical intraepithelial neoplasia 1,CIN 1)被认为是低度病变,以活动性 HPV 感染为特征,鉴于自然清除率很高,常进行非手术治疗。CIN2 和 CIN3 被认为是高级别病变(高级鳞状上皮内病变)。尽管 CIN 3 异质性较低,却是重要的诊断癌前病变依据,在有筛查项目的国家 CIN 2 通常是治疗的门槛。CIN 的治疗是通过外科手术或消融术来去除患处,患有高级别子宫颈病变的妇女比一般人群有更大的子宫颈疾病复发风险[25]。尽管确实存在未干预的情况下清除 CIN 的情况,但鉴于与观察自然史研究有关的伦理问题,有关清除率(尤其是高级 CIN)的精确数据并不完善。但是,如前所述,从 HPV 感染到浸润性癌症的过程通常需要数十年的时间。

2. 肛门和阴茎癌 第二大最常见的与 HPV 相关的肛门生殖器癌症是肛门癌,全球每年约有 40 000 例病例。与子宫颈癌相似,大多数肛门癌由 HPV 引起,其中大多数是由 HPV 16 引起的。男性和女性人群肛门癌的发病率均在上升,原因尚不明确,但可能受到性行为改变的影响。此外,与男性发生性关系的男性患肛门癌的风险明显更高,就像那些感染了 HIV 的人一样。这为建议这些人群接种特定的疫苗提供了信息[26]。关于肛门浸润前病变发展为癌症的自然历史和进展速度方面存在知识差距,尽管在某些情况下存在肛门癌筛查选择(使用细胞学和高分辨率肛门镜检查),但这些方法的成功率不如子宫颈癌,尤其是因为采取干预措施去除肛门上皮内瘤变(anal intraepithelial neoplasia,AIN)可能会导致高发病率[27]。阴茎癌相对罕见,每年约有 26 000 例病例,其中 HPV 阳性占 50%(几乎都为 HPV 16)。与其他组织学类型相比,疣/基底节组织学与 HPV 阳性的相关性更高。

3. 外阴和阴道癌 全球外阴癌病例数约为 34 000 例,其中 8500 例与 HPV 有关。HPV 相关外阴癌的主要类型为 HPV 16。外阴上皮内瘤变(vulvar intraepithelial neoplasia,VIN)在组织学上可分为"普通型"(usual VIN,uVIN)或"分化型"(differentiated VIN,dVIN)。这种分型的重要性在于,uVIN 与 HPV 相关性更高,并且更可能在年轻女性中发现,而 dVIN 通常 HPV 阴性,并且最常见于绝经后的高龄女性。

阴道癌是一种罕见的癌症,全球共有 15 000 例病例,其中约 75%与 HPV 相关(主要是 HPV 16)。阴道癌在绝经后女性中的发病率更高。尽管子宫颈癌筛查(以及相关的随访)为临床上在某种程度上识别病变提供了机会,但针对外阴癌和阴道癌的有组织的筛查程序尚不存在。

4. 口咽癌 在全球范围内,口咽鳞状细胞癌(oropharyngeal squamous cell carcinoma, OPSCC)的发病病例数约为 96 000 例。HPV 相关

OPSCC的可归因分数有所不同，OPSCC相关的HPV归因分数范围为15%～65%，在很大程度上与国家/地区相关[28]。但有一点非常恒定，那就是HR-HPV阳性OPSCC中有90%是由于HPV 16所致。在过去的20年中，OPSCC的发病率急剧上升，在某些国家，特别是那些进行子宫颈筛查的国家，OPSCC的发病率可能已超过子宫颈癌。OPSCC增加的原因包括性行为的暂时性变化，尤其是在口交行为方面，尽管也观察到与饮酒和吸烟相关的非HPV相关的OPSCC增加。在疾病进展和生存方面，HR-HPV阳性的OPSCC患者的预后优于HPV阴性，目前正在进行有关确定HPV感染是否可以影响/告知OPSCC患者治疗选择的试验。为此，HPV注释和检测可能在该病的治疗中发挥越来越大的作用[29-30]。

(六)预防性人乳头瘤病毒疫苗:原发癌预防

如上所述，预防HPV感染可预防癌症的发生，是3种当前已获认证的预防性HPV疫苗的基础。这些疫苗均为含HPV L1 VLP的蛋白质制剂，且无感染性，它们在用于生产的蛋白质表达系统、佐剂和靶向型别的数量上有所不同，但都作用于HPV 16和18。Cervarix针对这2种型别(2vHPV)，Gardasil还针对可引起生殖器疣器疣的HPV 6和11(4vHPV)，Gardasil 9(Merck)还针对HPV 31、33、45、52和58(9vHPV)[31]。HPV疫苗是在大型多国参加的Ⅲ期临床试验的基础上批准的，试验证明了这些疫苗的安全性和对疾病转归的有效性。最近，在已经实施全国范围免疫规划的国家中，已看到了在人口水平上对HPV流行、生殖器疣和子宫颈疾病的影响[32]。

尽管已证明2vHPV疫苗对HPV 31、33和45型具有显著的交叉保护作用，4vHPV也有一定的交叉保护，但疫苗通过引发对疫苗中构象完整的VLP的型特异的中和抗体应答而起作用[33]。3种疫苗最初均根据初免-加强系统的三剂方案批准的，即第一剂引起初免抗体，随后的两剂进一步提高抗体滴度。给药方案因各国家/地区的具体情况而有所不同，但WHO推荐15岁女孩使用两剂，15岁以上女孩和HIV阳性者使用三剂(间隔至少6个月)[34]。减少剂次可以降低疫苗的成本，以及给药的风险，还可以消除影响癌症发病率高的中低收入国家引入疫苗的障碍。随机对照试验数据的事后分析表明，一剂次疫苗可能是有效的，目前正在进行一剂次疫苗功效的前瞻性试验[35]。

该疫苗对女性和男性均有效，因此，一些国家选择了不分性别的疫苗接种方案。在女性疫苗接种率很高的情况下，由于"群体保护"(herd protection)(由于疫苗接种所致人群中病原体相关的患病率降低，未接种疫苗的个体总体风险降低)，降低了无性别接种疫苗的成本效益。关于为男性接种疫苗的决定可能并不完全基于成本效益，并且因国家/地区而异[36-37]。针对男同性恋目标性计划也已实施，因为他们没有获得仅针对女性计划的群体保护，并且与仅与女性发生性行为的男性相比，极易罹患HPV相关疾病[38]。

五、标本的收集、运输和储存

本节重点介绍与HPV检测和分型有关的标本收集问题。如上所述，HPV血清学的应用有限。但对HPV抗体的评估不需要进行专门的血液处理，样本通常为血清，血浆也可用。

由于HPV无法培养且与细胞相关联，因此研究人乳头瘤病毒感染是间接通过从特定细胞样本中提取核酸检测病毒DNA和分型。来自一个解剖部位的样本不能提供关于在不同部位感染的可能性的信息。可用活检组织检测，但对于筛查和自然病史/流行病学研究需要用无创采集的样本。样本收集方法需要符合因分析方法和敏感性而异的分子检测的要求，收集样本，以及样本被收集到检测的间隔时间决定了运输和存储的条件，核酸的有效保存是主要要求，以便保证HPV检测的正确性。

子宫颈取样方法的建立遵照已被用于为Pap试验优化的脱落细胞的收集步骤。在行内镜检查看到子宫颈时，使用各种收集工具(如拭子、子宫颈刷、扫帚等)从转化区和子宫颈的上皮表面收集细胞，将收集工具旋转指定的匝数以确保细胞产量。可以将细胞样本置于各种收集液中，如STM(Qiagen)、PreservCyt(Hologic)或SurePath(Becton Dickinson)。这种方法仍然是用于子宫颈癌筛查的首选方法，但为流行病学研究开发的阴道自我收集方法正在优化，以便用于没参加子宫颈筛查的人群[39-40]。在大多数情况下，女性通过将

采集设备插入阴道来采集样本,类似于插入卫生棉条的方法。收集设备可以是简单的拭子或更复杂的专用设备。通过洗涤或灌洗取样,类似于使用阴道冲洗器[41]。

初次排尿的尿样本可收集代表子宫颈的阴道池中的细胞,这种方法已在流行病学研究中使用,并正在进行检测是否可用于筛查[42-43]。尽管未用于临床管理,但肛门采样使用的方法类似于子宫颈收集细胞进行细胞学检查或 HPV 检测的采样方法。肛肠交界处是大多数病变发生的区域,用拭子或子宫颈刷旋转或摩擦采集该区域的脱落细胞。自我收集方法已成功用于流行病学研究。

由于角化阴茎和阴囊区域采样困难,使男性生殖器样本中 HPV 的流行病学研究难以进行。可以使用细砂纸采集细胞的方法,但是也可以使用涤纶或泡沫棉签擦拭生殖器表面。自-采样与卫生保健提供者收集的样本一样有效。

口咽很难无创取样。流行病学研究最佳收集细胞的方式是使用漱口水或生理盐水漱口。如果可见病灶,则可以使用棉签或刷子在表面取样。

HPV 在癌前和癌中的型特异性流行主要依赖于保存在病理档案中的福尔马林固定石蜡包埋样本的研究。福尔马林交联限制了 DNA 的大小,并且在使用常规加工时组织保存会有所不同。需要优化提取方法[44]。为避免 PCR 污染,必须对组织学切片进行处理(每个块均使用一次性的新鲜刀片、手套、无水浴)。推荐使用"三明治"切片法,该方法包括苏木素和曙红染色的第一个和最后一个病理切片,以便验证切片中的病变。

研究一致表明 HR-HPV 的检测在口咽癌中具有重要的预后价值,因此,人们在探索适合临床测试的采样方法。已经使用了多种材料,包括新鲜的或福尔马林固定的原发性肿瘤或淋巴结转移样本,以及细针抽吸的细胞材料。指南仍在开发中,方法需要标准化以提高可靠性[30,45]。

六、直接检测

(一)显微镜检查

组织学标本的常规光学显微镜检查是诊断上述临床意义部分所述的 HPV 相关疾病的基础。此外,子宫颈细胞学标本的显微镜检查(Pap 试验)在子宫颈癌筛查中也很有效。定义明确的核周晕(perinuclear halo),称为 koilocytosis(小口细胞增多),是低度子宫颈病变细胞的特征性表现(图 107-4*)。在疣和低级别子宫颈活检组织学中也可以看到小口细胞增多症。虽然组织学和细胞学改变提示 HPV 感染,但 HPV 的特异性检测需要通过分子学方法(请参阅核酸检测部分)来完成。

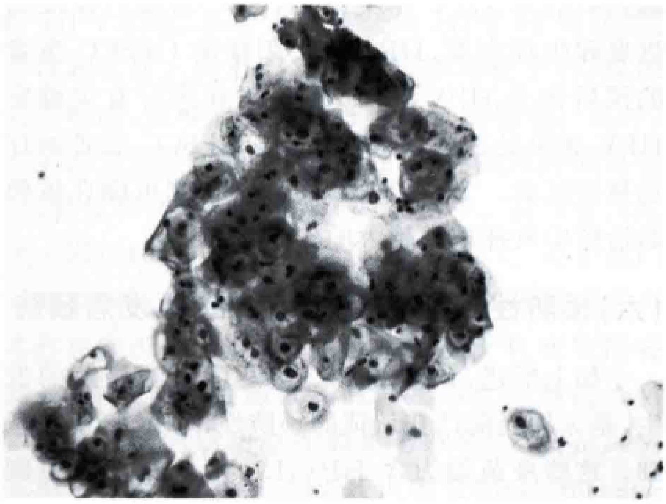


图 107-4 Koilocytosis. Exfoliated cervical cells showing a sharply demarcated large halo around nuclei known as koilocytosis. This is characteristic of productive HPV infection and would be given a cytology diagnosis of low-grade intraepithelial neoplasia. ThinPrep slide, Papanicolaou stain, original magnification 2003. (Image courtesy of Sue Mehew, Royal Infirmary of Edinburgh, United Kingdom.)

HPV 病毒颗粒可以通过电子显微镜(electren microscopy, EM)在高产毒性病变中可见。通常 EM 不用于 HPV 检测和诊断。完整病毒颗粒和 VLP 的 EM 非常相似,并且难以识别特定型的变化。VLP 的 EM 外观是用于 HPV 血清学试验试剂质量控制的一种方法(图 107-5)。

(二)抗原检测

抗原检测不用于 HPV 的鉴定或分型。对于以 HPV 作为疾病标志物的临床应用,研究了 HPV蛋白的直接检测,特别是在癌前病变和癌症

*译者注:原著引用其他著作图,未经原作者授权翻译,故此保留原图

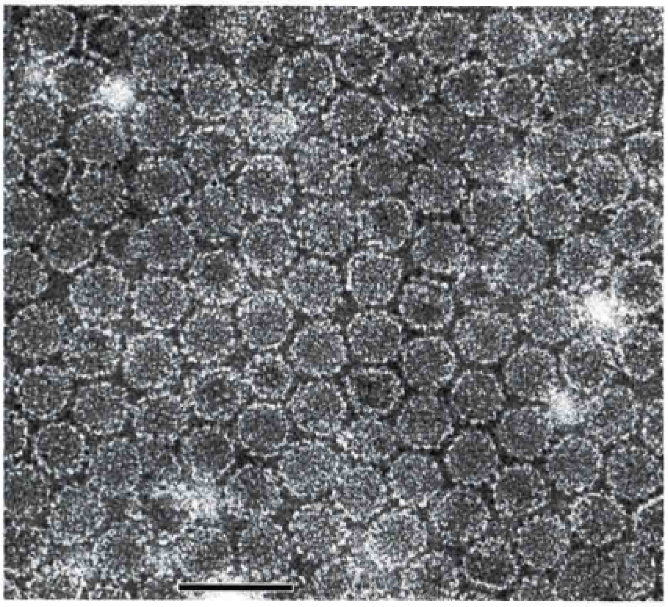


图107-5 HPV 18重组L1 VLP组装成六边形阵列的负染色电子显微照片。横线代表100 nm(图片由疾病预防控制中心Charles Humphrey提供)

病变过度表达的E6/E7癌蛋白。简单的蛋白检测法可以简化子宫颈癌的筛查方法。针对中低收入国家的快速检测,开发了一种针对E6癌蛋白的侧流免疫层析法(LFA)[46]。目前针对HPV 16和HPV 18 E6蛋白的OncoE6子宫颈测试已有商品化试剂盒。对于在资源匮乏的国家使用显示出一丝希望[47-48]。

(三)核酸检测

在临床应用中,HPV可作为检测潜在疾病(如子宫颈癌)的生物标志物,或作为预测预后(如口咽癌)的指南。在流行病学研究和HPV疫苗作用的监测中HPV检测很重要,但HPV本身尚无治疗方法。尽管许多分析方法均可用于流行病学研究和HPV疫苗作用的监测,但检测的敏感性和特异性是研究的重点,即可以准确检测到的病毒拷贝数。相反,临床所用的方法需要从能够发现疾病的角度来评估检测的敏感性和特异性(在验证指标一节中进一步讨论)。本章重点介绍临床上使用的HPV检测。表107-1总结了临床HPV检测的当前适应证。

核酸扩增试验(nucleic acid amplification technologies,NAATs)是HPV临床检测的主要技术,特别是针对筛查和治疗子宫颈疾病的HPV检测。就这方面来讲,HPV与临床病毒学实验室中的其他检测靶标没有区别,因敏感性、一致性和自动化方面的优势,培养和原位技术已经让位于分子检测方法。在最近的十年中,商品化HPV检测的增长是惊人的,涌现了大量在化学、自动化程度、平台、基因型范围都不同的检测方法,重要的是性能数据与应用相关的数量的增长。

表107-1 用于子宫颈筛查和疾病治疗的临床HPV检测适应证概述[a]

适应证	优势	局限性
初筛	对CIN2+检测敏感;HPV阴性结果后更长的时间筛查间隔 用于难以自我采集样本的人群 与细胞学相比,受疫苗接种的影响较小(?) 目的:对于没有细胞学筛查基础设施的国家更实用	尽管敏感,但不能检测到所有的CIN 2+ "筛查"HR-HPV阳性率高于细胞学阳性 在重大疾病中HR-HPV阳性预测意义小,需要另分类
低度细胞学异常分类	对CIN 2+检测敏感 降低HPV阴性者的随访强度,并减少不必要的阴道镜检查	PPV偏低,特别是在HR-HPV的患病率为70%~80%的LSIL中
治疗后监测(治愈测试)	对残留CIN 2+的检测敏感 对大多数检测HPV阴性的人的随访强度降低	治疗后检测到HR-HPV阳性者的PPV低(6个月时约20%)
预后	HPV阳性的口咽鳞状细胞癌可以采取不那么激进的治疗	采样和检测标准仍在制定中

注:[a] LSIL. 低度鳞状上皮内病变;PPV. 阳性预测值

最新报道详细介绍了2015年上市的商品化HPV检测的193种不同的检测方法(及其127种变化的/衍生方法)[49]。这中间涉及的大多数检测方法缺乏同行评议的发表文章作分析和(或)与子宫颈疾病相关临床应用的性能表现。由于亚临床型HPV感染的患病率比子宫颈疾病高,分析敏感性高,虽然在其他病毒和研究中受到重视,但HPV检测在子宫颈筛查中并无优势。HR-HPV检测用于子宫颈癌筛查的优势在于它的高敏感性和阴性预测价值。提高分析敏感性会降低临床特

异性，导致大量的不必要的其他检查做进一步评估。为了减少不适于诊断的无用检测，用于子宫颈筛查检测方法的验证指标应运而生。验证指标如下所述，检测必须达到最低的技术和临床性能水平才能批准用于临床。对 HPV 检测方法不断验证、核实是非常重要的。

从广义上讲，HPV NAATs 可以通过以下方面来分开：①扩增（信号或靶标）；②它们是基于 DNA 还是 RNA；③它们提供的基因分型水平（有限，扩展或广谱）。表 107-2 展示了一些检测方法及其关键特性的示例，包括上面已列出的检测方法。另一个概念性的重要方面是测定法是否已经通过临床验证并获得监管机构批准，可用于宫颈筛查。决定选择何种检测方法要考虑的因素与其他分析方法相似（表 107-3）。

表 107-2 根据靶标、基础技术和基因分型能力范围进行分子 HPV 检测的方法

类别	检测技术实例	商品化检测方法，实例	评价	应用领域
HR-HPV DNA 筛选测试[a,b]	使用共有引物（如实时 PCR）基于目的基因的扩增 或进行基于信号的扩增	混合捕获 2(HC2)HPV DNA 测试(Qiagen Inc.,Gaithersburg,MD) Amplicor HPV 测试((Roche Molecular Systems Inc.,Alameda,CA) 13 高危 HPV 实时 PCR 试剂盒(Hybridibio,中国北京) CareHPV test (Qiagen Inc.,Gaithersburg,MD)	HC2 是第一个获得 FDA 批准的 HPV 测试。这是基于信号的扩增测定。给定与 HC2 应用相关的数据量，新兴分析的技术和临床性能基于的 HC2 通常被用作比较分析 CareHPV 测试是针对中低收入国家/地区设计的测试	HPV 初筛 低度异常分类 治疗检验
HR-HPV DNA 同步或需进一步分型的筛查检测[c]	一般为靶向扩增基因分型元素可能涉及特异性引物/探针或扩增子需要进行"再次"类型的特定检测	Cobas 4800 HPV 测试(Roche Molecular Systems Inc.,Alameda,CA) Xpert HPV(Cepheid,Sunnyvale,CA) BD Onclarity HPV 分析(BD Diagnostics,Sparks,MD) 实时高危 HPV 检测(Abbott Molecular,Des Plaines,IL)	基因分型水平从 HPV 16 和 18(HPV 18 有时与 HPV 45 不能区分)到 6 个基因型的分类，并检测到另外 8 个基因型，分为 3 组(对于 Onclarity 测定法而言)。越来越多 HPV 型别获得了 FDA 的批准，包括所有列为示例的相邻单元格的那些	如上与初筛 HR-HPV 阳性妇女的分类
HPV DNA 完整基因分型测试	各方法，包括但不限于在逆线印迹杂交之前进行靶标扩增，基于 Luminex 的检测，毛细管电泳，多重实时 PCR，PCR 与测序结合以及质谱；详情请参阅参考文献[32]	线性阵列 HPV 基因分型测试(Roche Molecular Systems Inc.,Alameda,CA) Papillocheck 高风险测试(Greiner Bio-One, Frickenhausen,Germany) Clart HPV 2-乳头瘤病毒临床分析(Genomica,Coslada,Spain) Anyplex Ⅱ HPV HR 检测(Seegene,Seoul,Korea)	市面上最大的一组人乳头瘤病毒检测，有许多基础和检测技术。不同方法之间检测到的型别的程度和范围差异很大 一般而言，自动化程度低于上述两个类别 通常不适用于子宫颈筛查/疾病管理	研究和研发流行病学疫苗监测
HPV E6/E7 mRNA 检测(包括分型能力的检测)	包括 NASBA，实时 PCR，目的基因介导的相关扩增	APTIMA HPV 检测(Hologic,MadisNucliSENS Easy Q HPV (bioMérieux, Marcy l Etoile, France) PreTect SEE(Norchip,Klokkarstua,Norway) 用于子宫颈癌的 QuantiVirus HPV E6/E7 mRNA(DiaCarta LLC,Hayward,CA)	与 DNA 相关测试相比，基于 RNA 的测试更少。是个有争议的技术。若已检测到 E6/E7 转录本，mRNA 方法检测有临床意义的 HPV 感染可能更具特异性，与结构基因的 DNA 扩增相比，它可能是更好的致癌活性的指标 APTIMA HPV 测定法是目前唯一经 FDA 批准 用于宫颈筛查和疾病管理的基于 mRNA 的检测方法	取决于检测方法。但已经 FDA 批准的测定法(APTIMA)： HPV 初筛 低级别异常的分类 是否治愈的检验

注：[a] 除 HPV 66 和 HPV 68 外，筛查测试针对国际癌症研究机构认为属于高风险的 12 种 HPV 型别。[b] 有一组针对 IARC 定义的 12 种 HR-HPV 型别中的子类型的测试。上表未包括在内，因为上述类别通常适用于临床，筛查和流行病学应用。[c] 二次分型：在得到初筛阳性结果之后必须执行的二次测试，才能确定其类型特异性。一次性分型：单个试验功能可提供基因分型信息

表107-3 选择HPV试验需考虑的事项

检测的内容/驱动力是什么？
用于流行病学：需要有基因分型的检测方法，适合于各种生物标本最佳。如果结果不影响筛查/患者路径，则不需优先考虑监管批准
用于研究：取决于研究的性质，即基础研究或应用研究。前者可能首选分析敏感性高的检测方法。如结果不会影响筛查/患者路径，则无须监管部门批准
用于临床：特定的应用的证据基础是什么？它是否满足公认的最低性能标准？监管批准很重要（在某些国家/地区是强制性的）。所有的基因分型是否用于筛查/患者路径？如果是的，所用的平台是否将其作为一次性的或需追加二次测试提供？
测试地点的位置
中低收入国家（low-and middle-income countries，LMICs）：需要复杂机械和高水平实验室基础设施的花费高昂的测试/平台，可能是不合适的。易于使用和便携性显然很重要。中低收入国家患者随访的后勤保障可有利于其行就近或现场护理测试
高收入：该计划的性质是什么？由国家组织和监控的筛查程序通常依靠中心实验室，从而形成标准化的方法。在个体执业（医生或诊所）中更常见的机会性计划使实验室服务有更大的可变度
测试（标本）量需求
对于高通量测试（例如，初筛试验），除了要获得试验厂商的技术支持之外，robust自动化也是必不可少的，以最大限度地减少对时间/服务的影响。平台停机的突发事件是什么？自动化分析前步骤（即提取前的样品制备）有哪些选择/解决方案？
技术要求和成本
需要什么设备/仪器？是否需要实验室中没有其他应用的专用设备？需要哪些技术经验和技能？每次测定的试剂/供应成本是多少？设备维护费用是多少？

与其他种类病毒的检测方法相反，目前对HPV病毒载量（viral load，VL）精确定量的检测方法尚未商品化。由于HPV拷贝数在病灶和非病灶组织中分布不均，因此难以准确、重复地检测HPV拷贝数。所观察到的拷贝数可能会变化，取决于取到的脱落细胞样本代表病变的程度。此外，多种类型HPV混合感染是很常见的，累积病毒拷贝数和特定型别的拷贝数哪个最重要尚不清楚。最后，虽然大多数研究支持HPV 16 VL升高与CIN 3之间有相关性，但临床上有意义的风险阈值尚无法建立[50]。活动性感染（有病毒增殖的感染）实际上比非活动性感染（无病毒增殖的感染，但HPV可能发生整合）拷贝数更高。最近的研究表明，单时间点的VL与顺序VL相比无意义，后者的关键输出不是绝对值，而是两个点之间的斜率（不利结果时呈指数、对数型增长）[51]。当然，大多数已经商品化的测定方法，尤其是用于宫颈筛查的测定方法，都在定性方面得到了验证，并且可以根据用户的特定感兴趣的/使用目的，而不是根据制造商的意愿，从用户已经使用的相关数据中得出半定量的测量值。

（四）扩增策略和目标

大多数NAAT均为目标基因的扩增，常为PCR，但也包括以RNA为目标的转录介导的扩增或核酸序列为基础的扩增。虽然多种HPV基因组区域均可作为扩增目标，但最常见的实验方法是扩增L1，其次是E6的扩增检测。此外，引物/探针的选择可以是对于α乳头瘤病毒属内多个种的不同的型通用的，也可以是型特异性的。

分析报告方法有很大的不同。它们的范围从可视化的扩增子比色杂交到固定在条带上的探针阵列，到全自动实时PCR，可将Ct（循环阈值）值自动转换为“阳性”或“阴性”结果。理想情况下，分析还应包括并发在每个细胞中产生的人类管家基因或内源基因的扩增（如甘油醛3-磷酸脱氢酶或β-珠蛋白）作为样本扩增“适当”（“adequacy”）的质控。这种内源性对照还表明没有抑制物存在该反应中。即使有2种基因做对照，阳性对照探针仍不能替代小心的标准化的样本收集，还是不能完全排除问题。

与靶基因扩增分析相比，使用信号扩增的测试更少。但是，值得注意的是，第一个获得FDA批准用于子宫颈筛查的HPV检测-Digene Hybrid Capture 2 HPV DNA检测（HC2，Qiagen）-基于信号扩增。HC2测定与临床表现的大量纵向数据相关，并已用作评估新的检测方法的比较标准[52]。就像任何一个用临床医生样本研发和验证的检测方法一样，用自我采集样本的性能要求重新建立临床的性能。有证据表明，自我采集样本（请参阅采样部分）需要基于靶标的扩增试验才能达到与临床医生所采集样本可比的临床敏感性[39]。

由于 HPV 是双链 DNA 病毒，因此大多数分子检测都基于 DNA 的直接扩增。基于 RNA 的检测较为罕见，FDA 批准依赖于通过转录介导的扩增检测 E6/E7 mRNA 的 Aptima HPV 检测(Hologic)对于宫颈筛查而言相对稳定[53]。有证据表明，检测癌基因 mRNA 而不是检测结构基因(L1)的 DNA 可能会使瞬时 HPV 感染的检出降低，使临床特异性更高。但是，许多 HPV E6/E7 mRNA 检测呈阳性的人有短暂感染。

(五)基因分型

如前所述，即使在 HR-HPV 型别群中，自然史研究也证实了 CIN 2+ 按型分层的绝对风险，其中 HPV 16 的风险最高[54]。此外，经过相同的时间，特定型 HPV 持续感染比间断感染不同型 HPV 造成的病变发展的风险显著增高。因此，基因分型为遵循特定型趋势的纵向流行病学和研究提供了价值和深入的了解。HPV 基因分型已经产生了关于预防性 HPV 疫苗在实验人群及在人群/项目水平上的影响的重要数据[33,55]。此外，考虑到即使在高风险类别中的风险等级，HPV 基因分型也可以在筛查和临床管理中发挥作用。

现在无论是初筛还是子宫颈细胞学的共同检测试验，HPV 筛查在许多情况下已经成为现实。HPV 检测的高阴性预测值允许筛查间隔延长，但高敏感性伴随低特异性，可能会导致随访妇女过度医疗。由于在子宫颈疾病患病率低的年轻女性(25～30 岁以下)中，HPV 患病率最高，因此，通常只对 25 岁以上的女性进行 HPV 检测的初步筛查。这避免了临床上无意义的 HPV 检测并改进了检测子宫颈疾病的特异性。即使有年龄限制，也需要进行其他测试以提高临床治疗的有效性。在不同国家之间，关于 HPV 阳性妇女的分类方法存在一些不同[56]。HPV 16 和 HPV 18 的特异性鉴定是转诊阴道镜检查的一个更具证据基础的适应证，因为 HPV16/18 妇女患子宫颈疾病的风险更高[57]。也有证据表明，HR-HPV 组可以进一步分类为具有离散风险和与治疗指南相关的其他类别，以此作为使用扩大基因分型测定的正当理由。一项这样的提议确定了 5 组检测指导治疗(从最大到最小 3 年风险的 CIN 3+)：①HPV 16；②HPV 18/45；③HPV 31/33/58/52；④HPV 51/35/39/56/59/66/68；⑤HPV 阴性。治疗的范围从立即行阴道镜检查和活检(即使阴道镜结果为阴性)②到恢复常规筛查⑤[58]。

在过去的 5 年中，市场上大多数经过临床验证的高通量 HPV 检测方法都包含了一定的基因分型，包括 HPV 16 和 18，HPV 18 有时与 HPV 45 不能区分[59]。对于基因型分型要素是同时提供还是在阳性结果后作为辅助检查，检测方法各有不同。提供广谱分型功能(无论是否是高风险型别)的检测往往在自动化程度/高通量方面较差。这是一个快速发展的领域，现在已经存在 FDA 批准可提供超过 HPV 16/18 基因分型的检测方法，该方法与服务型实验室对通量的要求相一致。例如，一种这样的测定法，即 Onclarity HPV 测试(Becton Dickinson)，得出的结果可分出六种 HPV 型(16、18、31、45、51 和 52)及 3 组 HPV 型：33/58、56/59/66 和 35/39/68。

关于除高风险型以外的其他型的检测，没有证据表明对患者的治疗有意义[60]。被认为是“可能致癌”的型并不能提供明确的临床治疗方案。理论上讲，可能的致癌型与癌症可能有关，但其发生频率很低，因此，不在监管机构(如 FDA)批准的 HPV 原发性子宫颈癌筛查的检测范围内。通过包括这些其他型使敏感性增高并不能抵消特异性的显著降低[61]。这并不意味着指责广谱基因分型检测的存在，因为这些对于研究和监测工作也是重要的。但是，如同在筛查和临床背景下进行的所有 HPV 检测一样，HPV 基因分型应仅限于有循证依据的应用。

(六)自动化水平和技术复杂性

可用的检测方法和需求量的多样性从和这些检测方法相匹配的设备平台的多样性上可反映出来。从每天可以处理数百个样本并包含用于打开初级小瓶的预分析溶液解决方案的大型分析仪，到可以在初级保健或现场进行的床边快速诊断(point-of-care)试验。高通量分析仪的物理分离为提取和扩增平台正逐渐被将提取和扩增两者结合在一起的独立单元所取代。此外，可以连续加样的随到随做的方式也逐渐替代了传统 96 孔板的批处理/检测。而且许多更高通量的测定方法在可容纳其他分子微生物靶标(如沙眼衣原体和经血传播病毒)的平台上进行。

同样，就技术复杂性而言，各个平台之间及在支持性基础设备（包括物理环境和员工技能）方面的要求之间存在很大差异。当考虑在低收入和中等收入国家中是否适用时，这些都是重要因素。确实某些测定法更容易适应这种情况，包括基于具有较低的复杂性和较低的用电要求的 HC2 化学原理的测定法（Care HPV，Qiagen），以及仅需将 1 ml 样品添加到试管中的测定法（Xpert HPV，Cepheid）。Xpert HPV 是世界卫生组织宫颈癌体外诊断筛查资格预审名单中第一个被接受的检测方法（http://www./hivvrl/171221_final_pq_report_pqdx_0268_070_00.pdf）。

(七)下一代测序分析

下一代测序（next-generation sequencing，NGS）方法正在迅速过渡到临床实验室，尽管没有一种 HPV NGS 方法可用于临床应用，但已经报道了许多研究应用[62-64]。NGS 方法有可能拓宽可研究的 HPV 型别的范围，例如，依靠广泛覆盖的目标富集（broad-coverage target enrichment）[65]。此外，这些方法可以提供有关 HPV 变异株和整合状态的详细信息。L1 区的 DNA 条形码和序列共有扩增子的方法所提供的有关病毒的信息较少，但较短的读段可提高复用性。生物信息学中方法的改进和细化完善可以显著提高这种方法的可靠性并降低其用于流行病学研究的成本。

(八)辅助/分类检测

迫切需要研发能对 HPV 感染风险分类的检测方法，将临床上重要的 HPV 感染跟那些不重要的可清除的感染进行分型或“分类”。随着越来越多地将分子 HPV 检测作为主要筛选方法，需求变得更加合理。分类检查显然很重要，因为它可以告知女性是需要在阴道镜检查诊所检查还是可以更保守地进行检查[66]。可以说，关于 HPV 感染风险分层的分类检测是细胞学和有限的基因分型（如上文基因分型部分所述，使用 HPV 16/18 分型）。与其他 HR-HPV 类型相比，HPV 16 和 18 感染相关的癌症风险更高，证明了这种分类方法是合理的。但是，由于并非所有癌症都与 HPV 16/18 型相关，因此，HPV 阳性/HPV 16-18 阴性的女性仍需要进行一定程度的监测。以类似的方式，虽然通常 HPV 阳性/细胞学异常的女性需要行阴道镜检查，但 HPV 阳性，细胞学正常的女性的风险水平并不低到可以推荐出院做常规复查[67]。到目前为止，鉴定分类检测能够提供转诊至阴道镜检查与返回常规筛查的二元结果已被证明是可望而不可即的，这在国际上的分类方法中得到了证明[56]。

通过使用免疫细胞化学的辅助生物标志物染色可以进一步增强细胞学的性能。为此已使用指示在高级别的疾病中过度表达的指示异常增殖的蛋白质标记，如 p16INK4a（单独或与另一种增殖标记 Ki67 结合使用）。支持者认为，添加这些生物标志物可以消除形态学解释（棕色细胞质内的红色核是容易发现的疾病标记）的主观性。批评者认为，由于仍需要一定水平的主观解释，因此不能满足完全用分子解决对宫颈筛查的要求，但是分子 HR-HPV 检测可以做到。

不断发展的研究领域之一是检测甲基化（methylation）方法的开发和应用，甲基化是指 CH_3 基团以影响基因调控的方式转移到基因组中富含 GC 的区域。针对甲基化特征的工具的发展建立在长期的证据基础上，即某些“异常”甲基化模式是异常细胞增殖和癌症发展（包括子宫颈癌）的特征。焦磷酸测序和 NGS 等测序技术的发展促进了基础知识向实验室检测的转变。

L1 的高度甲基化会增加病变发展的风险，尤其是 HPV 16 的甲基化，包括 *CADM1*、*EPB41L3*、*FAM19A4*、*MAL*、*miR-124*、*PAX1* 和 *SOX1* 在内宿主基因的高度甲基化，也与癌症风险相关。尽管目前甲基化测定法尚不如 HPV NAAT 的建立/应用，但这些测定法的发展及其在宫颈癌筛查中的应用也在不断发展[68]。

七、分离过程

不能通过常规方法从病变组织或细胞中分离出 HPV。由于病毒的生命周期与宿主细胞的分化密切相关，用任何方法培养 HPV 都具有挑战性。无胸腺小鼠肾包膜下首次成功传代 HPV 体外移植标本[69]。随后，开发了多种系统来研究 PV 感染[70]。器官型培养提供了完全分化的环境，具有游离型 HPV 的人角质形成细胞可以完成整个病毒生命周期。可以使用与产生 VLPs 和准

病毒体类似的方法和包装细胞系将 HPV 引入单层培养[71-72]。这些都是重要的研究方法，但在 HPV 的临床鉴定中作用不大。

八、血清学试验

如前所述，因为对自然感染的免疫反应较弱且不一致，HPV 不是基于血清学分类。因此，临床上不使用 HPV 血清学，也没有可商购的检测 HPV 抗体的方法。但是，HPV 血清学是一种重要的研究工具，并且在诸如 HPV 疫苗试验中变得越来越重要。减少给药剂量方案和下一代生物仿制药疫苗的批准可能需要依赖于非劣效性的抗体效价[73]。当前疫苗的功效使安慰剂对照试验不合乎伦理，减轻了目标型别的人群负担，使得疾病终点，甚至是 HPV DNA 终点的达到均不可行。

已经审查了用于 HPV 疫苗学的 HPV 抗体测试[74]。中和试验被认为与抗体功能最佳相关。这些使用假病毒颗粒（pseudovirions）的带有信号质粒的 L1 VLP 作为感染模型，需要体外的哺乳动物细胞培养。中和抗体可阻断假病毒颗粒结合及将其信号质粒释放到细胞中。清洗并评估信号后，与空白样本相比，样本诱导的信号降低程度提供了中和抗体的半定量测量。然而，中和试验费时，某种形式的酶联免疫吸附实验（enzyme-linked immunosorbent assays，ELISA）更常用。在使用 ELISA 之前，需要验证 ELISA 和中和试验结果之间的相关性。ELISA 可以是直接结合测定法（通常检测 IgG），也可以是竞争性的，在这种情况下，针对一种中和表位的型特异性单克隆抗体可与任何类别的血清免疫球蛋白竞争。越来越多地需要进行多重免疫分析（使用多分析物孔或基于微珠的方法），以监测对由 Gardasil 9 靶向的 9 种型别的反应。由于试验设计的不同，不同试验间的差异在预料之中[75]。试验中使用平行方法改善了实验室间的可比性。国际标准的使用允许用国际单位报告结果，这是唯一可以在不同的实验形式间直接比较的方法。可从美国国家生物学标准和控制研究所获得有关 HPV 16 和 18 抗体的标准品，其他标准品正在研发中。

九、结果的评价、解释和报告

验证指标和质量监控 实验方法验证的实质取决于应用。如果实验的目标是研究性的并且依赖于样本中水平极低的病毒靶标的区分，则方法需要具有高分析敏感性。当研究重点依靠人群中特定型别流行的纵向趋势（如监测 HPV 疫苗的影响）时，长期的实验稳定性是另一个重要考虑因素。需要使用同一检测方法并严格监控质量控制，以避免检测方法导致的差异混淆了实际变化。

对于适合子宫颈筛查的检测方法，必须根据疾病终点校准其性能，以最大限度地减少测出对临床无关的感染。Meijer 及其同事于 2009 年设计的框架，为验证 30 岁及以上年龄的女性初次子宫颈癌筛查 HPV 检测方法提供了一种途径，这已被 HPV 界广泛认可采用[52]。在此框架中，候选试验性能的评估要与"金标准"试验的相应检测能力相比较，即公认的、有可接受的 CIN 2＋检测能力的实验方法，在这框架中还结合了实验室间和实验室内可重复性的最低要求，验证时使用的样本必须是来自子宫颈筛查样本。这是一个重要的元素，因为尽管新出来的检测方法的初始临床性能数据通常来自阴道镜检查人群（这样的人群起到了疾病富集的作用），但就疾病的数量和性质，以及测试实验的相关要求而言，此类转诊人群与初筛人群并不相似。到目前为止，已获得 FDA 批准的 HPV 试验方法具有特定的应用（包括初筛和低度异常的分类）都是经过了特定的样品收集和处理方法的平行评估的。与用于患者治疗的任何实验方法一样，正在进行的验证是多方面的、动态的，虽然通过 FDA 批准和（或）欧洲标准证书进行的性能验证很重要，但使用上述验证框架进行独立评估也很重要。

证明在检测环境中的技术能力及正在进行的质量监控和评估（包括但绝不仅限于参与外部质量评估计划）是必不可少的[76]。此外，进行诊断测试的实验室有义务符合其外部认证机构的标准，此类标准包括用于验证的足够的样本量和持续的质量监控，HPV 也不例外地必须接受这样的审查。美国病理学家学院之类的认可团体对某些实验方法可提供能力验证程序，通常这些程序使用已知的样本（克隆的 DNA），并不完全评估试验的

所有步骤。国际HPV中心为HPV DNA分型提供了一个技术精湛程度的考核盘，此分型适用于从事流行病学和HPV疫苗监控的实验室[77]。实验室间交换样本和重复质量控制也是帮助实验室确保结果可靠性的方法。美国国家生物标准和控制研究所提供了HPV DNA和HPV抗体的国际标准。另外，国际HPV参考中心可以提供重组质粒的构建。

本章中均为作者观点，并不代表疾病控制与预防中心的官方立场。

参考文献请扫二维码查阅

第108章 人类多瘤病毒

GREGORY A. STORCH, RICHARD S. BULLER

（张蕴莉 译；戴二黑、钱渊 审校）

一、分类学

从本手册的上一版开始，鉴定出新的人类多瘤病毒(human polyomaviruses, HPyVs)的步伐有所放慢；包括鉴定出2个新的多瘤病毒在内，多瘤病毒的总数现在为14种。多瘤病毒以前是乳头多瘤空泡病毒科(Papovaviridae)的成员，但已被重新分类为多瘤病毒科(Polyomaviridae)。国际病毒分类学委员会于2015年12月接受了多瘤病毒分类法最新更新的基于序列的修订版[1]。更新后的分类法将多瘤病毒科分为4个属：α、β、γ和δ多瘤病毒。多瘤病毒的种以宿主物种命名，后跟多瘤病毒和一个数字（指示其识别的时间顺序）。请注意，与其他病毒科一样，这种分类法使某些多瘤病毒具有正式分类法名称和通用名称。例如，引起人类感染的类型的通用名称是BK多瘤病毒(BK polyomavirus, BKPyV)，但现在的正式分类名称是人类多瘤病毒1(human polyomaviruses, HPyV 1)。在本章的其余部分中，需要选择通用名称和正式分类名称时，将使用通用名称。α多瘤病毒属包含以下人类病毒：梅克尔细胞多瘤病毒(Merkel cell polyomavirus, MCPyV, HPyV 5)、TS多瘤病毒(trichodysplasia spinulosa polyomavirus, TSPyV, HPyV 8)、HPyV 9、HPyV 12，以及最近发现的新泽西州多瘤病毒(New Jersey polyomavirus, NJPyV, HPyV 13)[2]。β多瘤病毒属的HPyV包括BK多瘤病毒(BK polyomavirus, BKPyV, HPyV 1)、JC多瘤病毒(JC polyomavirus, JCPyV, HPyV 2)、KI多瘤病毒(Karolinska Institutepolyomavirus, KIPyV, HPyV 3)和WU多瘤病毒(Washington University polyomavirus, WUPyV, HPyV 4)。当前，γ多瘤病毒属中没有HPyV，而δ多瘤病毒属包含HPyV6及HPyV7、马拉维多瘤病毒(Malawi polyomavirus, MWPyV, HPyV 10)和圣路易多瘤病毒(Saint Louis polyomavirus, STLPyV, HPyV 11)。最近鉴定出的多瘤病毒是Lyon IARC多瘤病毒(Lyon IARC polyomavirus, LIPyV, HPyV 14)。LI多瘤病毒与浣熊多瘤病毒(raccoon polyomavirus)最密切相关，暂时将其置于α多瘤病毒属中[3]。表108-1显示了当前人类多瘤病毒的分类。

由于一些新的人类多瘤病毒是在1个以上实验室中几乎同时发现的，因此在文献中可以找到看似相同的病毒或相同病毒的不同病毒株的名称。例如，Mx多瘤病毒[4-5]看起来与MWPyV(HPyV 10)是同一种[6]。在本手册的上一版中，此处列出了淋巴细胞多瘤病毒(lymphocytic polyomavirus, LPyV)，是非洲绿猴多瘤病毒的一个株，因为已报道了在人体中发现了该病毒的抗体，提示人类可能会感染LPyV或密切相关的LPyV类似病毒。目前发现HPyV9病毒可能是与此相关的LPyV类似病毒[7]。

从诊断的角度来看，多瘤病毒的进一步分型对BK多瘤病毒和JC多瘤病毒尤为重要。最初根据VP1基因序列将BK多瘤病毒分为6个亚型，然而，全基因组序列数据支持其分为4个亚型(Ⅰ～Ⅳ)，另2个亚型被重新分类为亚型Ⅰ的子群[8]。各亚型的流行程度和地理分布不同[9]。亚型Ⅰ流行最为广泛普遍，在全世界范围内均有发现；其次是Ⅳ亚型，主要见于亚洲和欧洲。亚型Ⅱ和Ⅲ不常见，但世界各地均有发现。与BK多瘤病毒一样，JC多瘤病毒具有7个基因型，它们与不同的地理区域和人口相关，并且具有多个亚

型[10]。已经观察到根据亚型来定量有偏倚存在，可造成定量检测不同试验的差异(请参阅下面的核酸扩增方法)。

表 108-1 人类多瘤病毒的分类(多瘤病毒科)

种	通用名称(缩写)
α多瘤病毒属	
人多瘤病毒5	梅克尔细胞多瘤病毒(MCPyV)
人多瘤病毒8	TS多瘤病毒(TSPyV)
人多瘤病毒9	(HPyV9)
人多瘤病毒12	(HPyV12)
人类多瘤病毒13	新泽西州多瘤病毒(NJPyV)
人多瘤病毒14[a]	里昂IARC多瘤病毒(LIPyV)
β多瘤病毒属	
人多瘤病毒1	BK病毒(BKPyV)
人多瘤病毒2	JC病毒(JCPyV)
人多瘤病毒3	KI(卡罗林斯卡研究所)病毒(KIPyV)
人多瘤病毒4	WU(华盛顿大学)病毒(WUPyV)
δ多瘤病毒属	
人多瘤病毒6	(HPyV6)
人多瘤病毒7	(HPyV7)
人多瘤病毒10	马拉维多瘤病毒(MWPyV)
人多瘤病毒11	圣路易多瘤病毒(STLPyV)

注：[a] 推测的人类多瘤病毒。该病毒尚未正式命名或分类

二、病原体的描述

多瘤病毒体积微小(直径40～50 nm)，呈二十面体，是包含一个环状双链DNA基因组的无包膜病毒。所有人类病毒的基因组相对较小，包括新发现的病毒和猴病毒40(SV40)，基因组全长为4800～5400 bp。JC多瘤病毒、BK多瘤病毒和猴病毒40已被广泛研究，而新发现的病毒相对研究较少。

病毒基因组由早期区和晚期区组成，早期区在DNA复制之前开始转录，晚期区在DNA复制之后开始转录。非编码控制区(noncoding controlregion，NCCR)将早期和晚期区隔开，并包括复制起始点[11]。

早期区转录子编码大T抗原和小T抗原及用以调节病毒复制、控制病毒转录及诱导宿主细胞分裂和转化的非结构蛋白。晚期区基因转录子编码病毒衣壳蛋白VP1、VP2和VP3，其中VP1是主要的衣壳蛋白，构成约80%的衣壳，是唯一暴露在病毒表面的蛋白[11]。JC多瘤病毒、BK多瘤病毒和猴病毒40的晚期区也编码第四晚期蛋白，称作未知蛋白，目前并不完全了解它的功能，似乎是一种非结构蛋白，参与病毒在感染细胞内的组装与释放[11]。

新发现的多瘤病毒基因组结构与之前描述的那些多瘤病毒相似，具有已经识别的大、小T抗原和VP1、VP2、VP3的可读框[2-3,6,12-14]。这些病毒与JC多瘤病毒和BK多瘤病毒不同的是不存在未知蛋白的可读框[6,12-14]。

BK多瘤病毒和JC多瘤病毒的非编码控制区是长度为300～500 bp的高变序列。非编码控制区包含有复制起始点和早期区、晚期区基因转录的启动子。当对不同部位采集标本获得的病毒进行非编码控制区的序列比较时，该区具有的变异特性是很明显的。从肾脏和尿中分离的病毒株的非编码控制序列被认为是原型，而具有原型NCCR序列的病毒在细胞培养时不能很好地复制，可能是该病毒的感染形式。原型非编码控制区的重排可能在大脑的病变部位发现。

多瘤病毒一个鲜为人知的特征是其能够建立持续感染。对于2个临床上最重要的HPyV：BKPyV和JCPyV，使用分子方法(如PCR和原位杂交)的研究表明泌尿生殖道、中枢神经系统和造血系统是持续存在的潜在位置[15]。但是，建立和维持持续存在的分子机制尚不清楚。

最后，研究表明MCPyV可以整合到宿主细胞染色体中，这是引起细胞，至少是一些梅克尔细胞癌(Merkel cell carcinomas)的发生中起重要作用的一步[16]。一个病例报告中描述了尿路上皮癌病例的12号染色体上整合了新的BKyPV毒株，提示HPyV可能是某些人类癌症的一个因素[17]。

三、流行病学和传播

到成人期，多瘤病毒中2个最重要的病毒，BK多瘤病毒和JC多瘤病毒的感染大多发生了。血清流行病学研究显示50%的儿童到3岁时机体获得抗BK多瘤病毒的抗体，到6岁时获得抗JCPyV抗体[18]。对于所有年长年龄组，两种病毒的血清阳性率均为55%～85%，但JC多瘤病毒比BK多瘤病毒在血清抗体阳转年龄段的变化更

大[19]。BK 多瘤病毒和 JC 多瘤病毒的传播机制大多是推测的，部分原因在于原发感染并不引起临床疾病，尽管有症状和体征（如伴随血清转化的发热或呼吸道疾病）的报道[19]。JC 多瘤病毒可以感染扁桃体细胞[20]，并且可在扁桃体组织中检测到该病毒[21]，人们推测该病毒经呼吸道和口腔传播。Sadeghi 等使用能够检测 HPyV 1～13 的多重 PCR 技术检测扁桃体组织标本，可检测到 JCPyV、WUPyV、MCPyV、HPyV 6 和 TSPyV，提示该组织可能是这些病毒感染和（或）持久存在的场所[22]。然而，研究并没有在呼吸道和口腔样本中检测到 BK 多瘤病毒和 JC 多瘤病毒[23-24]。一直以来人们推测 BK 多瘤病毒和 JC 多瘤病毒经尿-口腔途径传播，其间接证据包括免疫力正常和免疫受损个体的尿中均有间歇性病毒排出[19,25]，在生活污水中亦检测到 BK 多瘤病毒和 JC 多瘤病毒[26-28]，以及这些无包膜病毒的稳定性。一项对墨西哥婴儿粪便标本的研究发现，在 64% 的婴儿中，有 18% 的标本中含有 BK 多瘤病毒。这些发现表明胃肠道也可能是感染和持续存在的部位[29]。

对于其他的人类多瘤病毒的流行病学和传播知之甚少。WU 多瘤病毒和 KI 多瘤病毒在呼吸道分泌物中被检测到，且在全球广泛分布[30-38]。在 1 例出生 1 天的婴儿呼吸道分泌物中检测到 WU 多瘤病毒，提示存在子宫内或生产时感染的可能性[36]。也有研究在少数血清及粪便标本中检测到 WU 多瘤病毒[39-40]。在呼吸道标本中也发现 MC 多瘤病毒，在儿童和成人血清阳性率分别为 50% 和 80%，提示该病毒感染普遍存在[16,41-43]。同样，成年人 TSPyV 感染的血清阳性率为 74%，并且有证据表明呼吸道是其感染部位[44-45]。

对最近发现的多瘤病毒的流行病学研究仍处于起步阶段，最初的血清流行病学研究显示这些病毒的感染也普遍存在。在儿童时病毒血清阳性率较低，到成人期其血清阳性率升高，根据病毒的不同，血清阳性率可达 25%～90%[46-47]。对于这些结果的解释应当十分谨慎，因为多瘤病毒之间可能存在交叉反应（cross-reactions），很可能存在未被发现的多瘤病毒型别会影响对血清阳性率研究的进一步解释[47]。最近一项美国皮肤癌研究的 450 份年龄和性别相匹配的血清流行病学研究表明，对于 HPyV 1 到 HPyV 10，从 HPyV 9 的血清阳性率 17.6% 到 HPyV 10 的血清阳性率 99.1%[48]。相同的研究表明，人体血清存在针对 HPyV 1 至 HPyV 10 不同的抗体，平均有针对 7 种 HpyVs 的抗体。看来 HPyV 的感染在人类中很常见，而且感染特定病毒的年龄和可能的感染途径也有所不同。

除了 HPyV 外，在 1955—1963 年，由于某些批次的脊髓灰质炎疫苗未完全被福尔马林灭活，而被非人类的灵长类多瘤病毒 SV40（non-human primate polyomavirus SV40）污染，人类遭受该病毒的感染。用于制备疫苗的猴肾细胞是污染的来源。在污染疫苗中存在的感染性脊髓灰质炎病毒导致了近 200 例小儿麻痹症。虽然这段时间多达 1 亿美国人接种过该疫苗，但其中有多少批次疫苗污染了有传染性的 SV40 或者有多少人因此感染 SV40，便不得而知了[49]。一些研究表明 SV40 正在人类中持续传播[29]，但缺乏严格的认证。

四、临床意义

多瘤病毒在不同的患者人群中引起多种疾病（表 108-2）。当前的理解是由 HPyVs 引起的疾病似乎主要发生在免疫功能低下的患者中（WU 多瘤病毒或 KI 多瘤病毒引起的呼吸道感染和疾病可能例外）。进行性多灶性白质脑病（progressive multifocal leukoencephalopathy，PML）是一种罕见的、由 JC 多瘤病毒感染并破坏少突胶质细胞髓鞘生成而引起的中枢神经系统疾病（central nervous system，CNS），它发生在某些免疫受损的患者群体中，其特征是 JCPyV 破坏了产生髓磷脂的少突胶质细胞。通过磁共振成像等神经影像研究，可以直接观测到灶性白质脱髓鞘（图 108-1*）。神经系统症状和体征包括步态或其他运动障碍，以及认知的异常情况[50]。患者预后较差，生存期大于12个月即为

*译者注：原著引用其他著作图，未经原作者授权翻译，故此保留原图

表 108-2 与人类多瘤病毒相关的疾病

病毒	疾病相关性	注释(参考文献)
BK 多瘤病毒	多瘤病毒相关性肾病(polyomavirus-associated nephropathy, PVAN)	主要发生在肾移植接受者[58];很少发生在其他免疫功能不全宿主(HIV、血液恶性肿瘤、造血干细胞移植、肾脏以外的其他器官移植和先天免疫缺陷病)
	出血性膀胱炎	主要发生在骨髓移植的患者,该人群的发生率为 10%~25%[70]
	罕见的相关疾病	报道过的有中枢神经系统感染和肺炎[59]
JC 多瘤病毒	进行性多灶性白质脑病(PML)	见于细胞免疫功能不全的患者(HIV/AIDS、恶性肿瘤、接受免疫调理治疗的多发性硬化症及银屑病患者)[51,190-193]
	多瘤病毒相关肾病(PVAN)	与少数 BK 多瘤病毒阴性的多瘤病毒相关肾病有关[68-69,128]
	罕见的相关疾病	其他的中枢神经系统疾病,如已被报道的大脑萎缩和颗粒细胞神经元病变[55-57]
WU 多瘤病毒和 KI 多瘤病毒	无肯定的疾病相关性	在呼吸道分泌物、粪便标本和血液[31-32,35-36,74-79,143]及免疫受损患者的组织[80-82]中检测到
MC 多瘤病毒	梅克尔细胞癌	与 75%~88%的梅克尔细胞癌相关[16,83,194-195];在呼吸道标本中也检测到该病毒,提示经呼吸道是该病毒的一种感染方式[41-42,86]
人类多瘤病毒 6 和人类多瘤病毒 7	无肯定的疾病相关性	在 11%~14% 的受检测的健康人皮肤中可以检测到[85],患有各种皮肤病的患者,如皮疹、瘙痒和角化不全的皮肤病及角膜棘皮瘤[93-95]
TS 多瘤病毒	Trichodysplasia spinulosa	虽然在正常组织也偶尔检测到病毒 DNA[89],但与不同地区的 Trichodysplasia spinulosa 相关[89,91,196-198]。另外,有报道指出在 1 例心肌炎死亡病例中可检测到 TSPyV[92]
人类多瘤病毒 9	无肯定的疾病相关性	最初是在一例肾移植患者的血清中检测到此病毒,随后在其他免疫功能不全患者的很少的标本中发现此病毒;其与非人类灵长类多瘤病毒 LPyV 亲缘关系很近,这可能解释为何人类血清中出现抗 LPyV 抗体[7]
MW 多瘤病毒	无肯定的疾病相关性	最初在马拉维一例患痢疾儿童的粪便中检测到,随后在美国人粪便中检测出该病毒[6]。这可能与最初报道的从粪便标本分离的 Mx 多瘤病毒[5]和来自免疫功能不全患者疣状物分离的人类多瘤病毒 10[4]为同一病毒种。也已在呼吸道标本中检测到该病毒,但尚无明确证据表明可引起呼吸道或胃肠道疾病[97-98]
STL 多瘤病毒	无肯定的疾病相关性	最初在一位马拉维儿童的粪便中检测到,随后在 1% 以下的美国人及冈比亚人的粪便中检测到此病毒[13]。据报道,该病毒与已知的胃肠道病原体共感染,在无症状患者中更常见[96]
人类多瘤病毒 12	无肯定的疾病相关性	最初在一例癌症患者的肝组织中检测到,随后在其他肝脏标本中检测到,且在类似患者的结肠、直肠与粪便标本中也偶然检测到此病毒[12]
NJ 多瘤病毒	无肯定的疾病相关性	在胰腺移植受者肌炎位置的内皮细胞中鉴定出[2]
LI 多瘤病毒	无肯定的疾病相关性	约有 2%以内皮肤和口腔含漱液样本中可以检测出来[3]
猴病毒 40	无肯定的疾病相关性	发现于受污染的脊髓灰质炎疫苗的灵长类病毒[49,99-101]

长期存活,除非潜在的免疫抑制作用可以减低[11]。在高效抗逆转录病毒疗法(highly active antiretroviral therapy, HAART)实施以前,PML 主要见于免疫功能严重受损的 HIV 感染患者。随着 HAART 的出现,PML 在 HIV 感染者中已不常见,但在接受免疫调节剂治疗的患者中开始出现 PML,特别是使用那他珠单抗(natalizumab)治疗多发性硬化的患者中。efalizumab(Raptiva,自从上市以来)用于治疗牛皮癣;利妥昔单抗(maptera)用于治疗系统性红斑狼疮和淋巴增生性疾病;英夫利昔单抗(remicade),用于治疗克罗恩病和牛皮癣[51]。PML 风险似乎最高,对使用那他珠单抗治疗多发性硬化症进行了彻底研究。PML 在这组人群中并不常见(发病率约为 3/1000 的接受治疗的患者),但以下三大危险因素已被发现:①使用那他珠单抗治疗的持续时间;②先前使

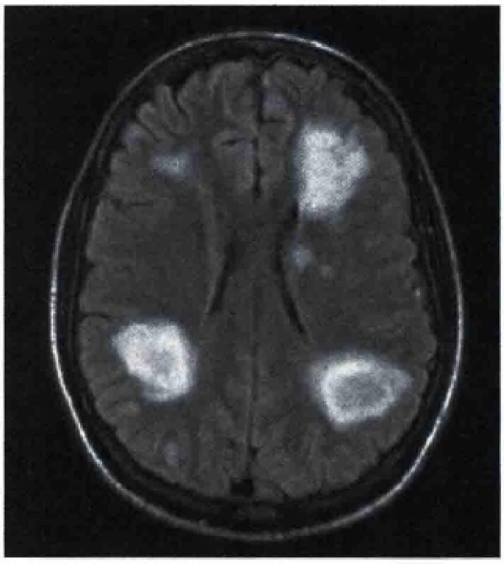


图 108-1 MR image showing the brain of a patient with lesions of advanced PML. Lesions are seen bilaterally in frontal lobes and in parietooccipital subcortical regions. Note that the cortex is spared, with lesions primarily in white matter, consistent with the pathology of demyelination of white matter tracts (fluidattenuated inversion recovery T2-weighted MR). Reprinted with permission of the publisher, Lippincott Williams & Wilkins, from reference 189.

用过免疫抑制剂;③阳性 JC 多瘤病毒抗体的存在情况[52-53]。但是,最近的一项研究表明,在接受那他珠单抗治疗的 JCPyV 血清反应阳性患者中,PML 的发生率要高得多,尤其是在之前接受免疫抑制治疗患者中,治疗 25～48 个月发生 PML 的发生率为 19.5/1000[54]。在有效的抗 HIV 疗法产生之前,PML 的死亡率接近 100%,现在已经下降到 50%。由免疫调节剂诱导产生的 PML 的死亡率更低,但伴随有严重的神经系统后遗症[55]。其他的中枢神经系统疾病如大脑萎缩和颗粒细胞神经元病变似乎是 JC 多瘤病毒感染引起的比较罕见的并发症[55-56]。在肾移植受者中发现 1 例非典型的 JCPyV 脑病病例,其疾病对同种异体移植物的去除和免疫抑制疗法的停止有反应,证明了在其他免疫功能低下的人群中将 JCPyV 作为引起中枢神经系统疾病原因的重要性[57]。

BK 多瘤病毒倾向于感染尿道上皮细胞并引起一系列症状。无症状的排病毒现象(shedding)可以发生在正常人(特别是妊娠期妇女和老年人)和免疫功能不全患者的尿中。多瘤病毒相关肾病(polymavirus-associated nephropathy, PVAN)发生在免疫功能不全患者中,是由 BK 多瘤病毒在肾小管上皮细胞内复制而造成肾小管上皮细胞破坏所引发的疾病,最常发生在接受肾脏移植的患者[58]。BK 多瘤病毒也被认为是一种在免疫缺陷疾病状态下引发肾病的罕见病因,如 HIV、血液性恶性肿瘤、造血干细胞移植、肾以外的其他器官移植和先天性免疫缺陷[59]。

多瘤病毒相关肾病最初表现为尿中病毒含量不断增高,接着发生病毒血症(viremia)[60-61]。在无临床干预措施的情况下,多瘤病毒相关肾病可以导致移植肾功能障碍,最终导致移植失败[62]。在对 78 例肾移植患者的前瞻性研究中发现多瘤病毒相关肾病的发生概率为 8%[61]。比较强效的免疫抑制剂的使用[62]、从供体肾获得 BK 多瘤病毒或者人类白细胞抗原(human leukocyte antigen, HLA)介导的易患病体质往往使肾移植患者更易诱发多瘤病毒相关肾病[63-64]。多瘤病毒相关肾病可以通过减少免疫抑制进行治疗,也已经使用一些抗病毒药物进行治疗,包括西多福韦和研究用药物溴西多福韦(brincidofovir)[60,65-67]。也有报道发现 JC 多瘤病毒可引起多瘤病毒相关肾病,但十分罕见[68-69]。

BK 多瘤病毒引起的其他病理状态包括血尿、输尿管狭窄和出血性膀胱炎。出血性膀胱炎是由 BK 多瘤病毒感染膀胱上皮细胞所致,它最常发生于干细胞移植患者,在 HIV 感染等其他免疫功能不全状态下较少发生。异体干细胞移植接受者具有极大的感染风险,往往在移植数周后发病,与化疗相关疾病不同,后者在化疗后立刻发生。出血性膀胱炎具有极高的发病率但罕有死亡病例[70]。此病发生的风险与 BK 多瘤病毒在病毒尿症(viruria)[71]和病毒血症[72]中的水平不断增高相关。虽然已经有尝试使用选择性抗病毒药物,但仍以支持治疗为主[70]。在 HIV 感染和移植后等免疫功能不全的患者中,BK 病毒感染引起的较罕见疾病有播散性疾病、中枢神经系统感染、视网膜炎、结肠炎、血管炎(脉管炎)及肺炎[59,73]。也有人担心 BK 多瘤病毒可能导致某些人类癌症的发生,尤其是前列腺癌。然而,目前亟需更多证据解答的问题是 BK 多瘤病毒是否是引起任何人类癌症的重要原因[73]。

试图了解新发现的多瘤病毒与特定的人类疾病相关性的研究一直在进行。在呼吸道标本中经

常检测到 KI 多瘤病毒和 WU 多瘤病毒，但由于其他共感染性呼吸道病毒的频繁出现及在无症状患者中也可检测到，因此，仍不能确定 KI 多瘤病毒和 WU 多瘤病毒与人类疾病相关[10,74]。但是，最近的一些报道显示，在(免疫力)正常患者患呼吸道疾病时 WU 多瘤病毒或 KI 多瘤病毒可作为唯一的被检出病原体，表明这些病毒在某些情况下可能引起呼吸道疾病[75-79]。在不同免疫抑制患者的呼吸道组织中也可检测到 WU 多瘤病毒，但患者的病毒感染和疾病之间的确定关系尚未被证实[80-82]。

梅克尔细胞癌是一种罕见的、高侵袭性的皮肤神经上皮瘤，以高死亡率而引起关注。在 2008 年，采用分子病毒检测技术在该癌组织中发现了一种新型的多瘤病毒[83]（表 108-2）。随后的研究表明，MC 多瘤病毒可克隆性低整合到高达 80% 的梅克尔细胞癌的基因组中[16]。虽然在正常人的皮肤样本中也可以检测到 MC 多瘤病毒[84]，有研究指出，MC 多瘤病毒的完整病毒颗粒可以长期从健康人的皮肤中排毒，考虑这可能是此病毒的一种传播方式[85]。尽管 MC 多瘤病毒是否是引起呼吸道疾病的原因尚不清楚，但 MC 多瘤病毒也存在于呼吸道标本中，包括来自急性呼吸道疾病患者的标本[41-42,86]。实际上 MC 多瘤病毒感染是普遍存在的，而梅克尔细胞癌却很罕见，提示除病毒以外的其他因素在梅克尔细胞癌的发生中也是重要的，已确定的危险因素包括免疫抑制、阳光暴晒、女性以及年龄>69 岁[16,84]。

Trichodysplasia spinulosa 是一种罕见的皮肤病，只发生于免疫功能不全的个体[84]。在 2010 年，从一位心脏移植接受者的标本中检测出一种新型人类多瘤病毒，随后被命名为 TS 多瘤病毒[87]，并证实了先前在电子显微镜下观察到多瘤病毒样颗粒的报道[88]。在 Trichodysplasia spinulosa 受损的部位含有高病毒载量和病毒蛋白，提示在病灶部位 TS 多瘤病毒复制活跃[89]。和其他人类多瘤病毒的感染一样，TS 多瘤病毒的感染普遍存在，血清流行病学的研究显示，在儿童期其血清阳性率很低，到成人期可升高到 70%[90-91]。尽管对 TS 多瘤病毒的血清反应阳性率很高，但是 Trichodysplasia spinulosa 的病例数却很少。有人提出该疾病的发生更多是由原发感染而不是重新激活引起的[45]，血液和脑脊液中高水平的病毒载量，提示播散性感染，也已经有报道[45]。日本的一个病例报告描述了 1 例免疫功能明显正常的 7 个月大女孩的心肌炎死亡病例，TS 多瘤病毒是在心脏组织中检测到的唯一病原体，但是否是其致病原因没有证实[92]。

已有报告表明 HPyV 6 和 HPyV 7 由皮肤排毒[85]，最近研究表明这些病毒与某些皮肤病有关[93-94]。一项针对非黑素瘤皮肤病变的研究表明，42% 的角棘皮瘤中存在 HPyV 6。在其他几种皮肤癌中也检测到了 HPyV 6，但其检出率与正常皮肤中的检出率没有明显差异[95]。尽管有趣，但这些结果需要进一步研究以证明 HPyV 6 和 HPyV 7 是否是这些疾病的致病原因。

在有症状患者的呼吸道和粪便标本中检测到了 STLPyV 和 MWPyV，因为常伴随感染其他病原体及无症状患者的检出率通常高于有症状个体[96-98]，因此缺乏支持 2 种多瘤病毒是致病原因的证据。迄今为止，还没有证据表明其余 HPyV、NJPyV 和 LIPyV 的致病性。

最后，因为对多瘤病毒在诱发癌症中作用的了解，长期以来一直担心这些病毒可能是某些人类癌症的原因。多年以来，许多研究尝试探求 SV40 和人类癌症之间的联系，其中有些研究成功发现一些联系。但是，一些研究结果是无法复制的，可能的影响因素包括质粒的污染及 BK 多瘤病毒和 JC 多瘤病毒之间存在血清交叉反应[49]。虽然尚有争议，但一致认为，除了 MC 多瘤病毒外，目前，没有可靠证据证实不管是人源性的还是动物源性的多瘤病毒是人类癌症的重要病因。对这个问题感兴趣的读者可以参阅一些与本主题相关的高水平综述[49,99-101]。

五、标本的采集、运输和储存

虽然还没有关于多瘤病毒临床标本的系统研究报道，正像人们对这些无包膜 DNA 病毒所预期的那样，这些多瘤病毒似乎十分稳定。一项关于在 20℃ 生活污水中 JC 多瘤病毒稳定性的研究发现，其 t_{90} 值(由定量 PCR 检测病毒浓度下降 90% 所需的时间)为 64 天，t_{99} 值为 127 天，当病毒悬浮在磷酸盐缓冲液中时，其 t_{90} 值更高，达 111 天[102]。这些数据提示与病毒诊断(第 81 章)有关的标本收集、运输和贮存的标准指南对于多瘤病

毒应该是恰当的。

用来检测多瘤病毒的常见送检标本包括血液、脑脊液(cerebrospinal fluid,CSF)、尿、呼吸道标本和组织标本。可以从外周血单个核细胞中找到多瘤病毒,此方法通常用于科研目的。由于临床实验室中 HPyV 的检测通常依赖于分子方法,因此指南中标本的收集和运输通常适用于分子检测[103](第 81 章)。如果有诊断试剂盒,应按照生产厂家有关标本的收集、运输和储藏说明进行。因为核酸检测是临床标本多瘤病毒检测的主要方法,提取好的DNA 应贮存在密封的和低结合(核酸)度塑料管中,防止 DNA 蒸发或结合于管壁上[103]。DNA 在 Tris-EDTA 缓冲液中,2～8℃中可保存至多一年,－20℃可保存到 7 年,－70℃或者更低温度下则至少可以保存 7 年[103]。其他研究表明,病毒核酸提取物于－20℃冷冻保存或4℃ 冷藏对其核酸定量结果无影响[104]。

六、直接检查

(一)显微镜检查

肾活检的组织学评估是诊断多瘤病毒相关肾病的金标准[60]。多瘤病毒相关肾病是一种肾小管间质性肾炎,与同种异体排斥反应的病理表现相似[58,105-107]。与排斥反应不同的是,特征性的嗜碱性、核内病毒包涵体可在多瘤病毒相关肾病中见到(图 108-2)[58,105,107]。由于分散的分布不均的特性,在排除多瘤病毒相关肾病之前至少应查看两份组织活检标本[60,106]。对多瘤病毒相关肾病患者的尿沉渣进行巴氏染色,结果显示有异常包涵体细胞,由于与恶性癌细胞相似,故称为"诱饵细胞"(图 108-2)[108]。

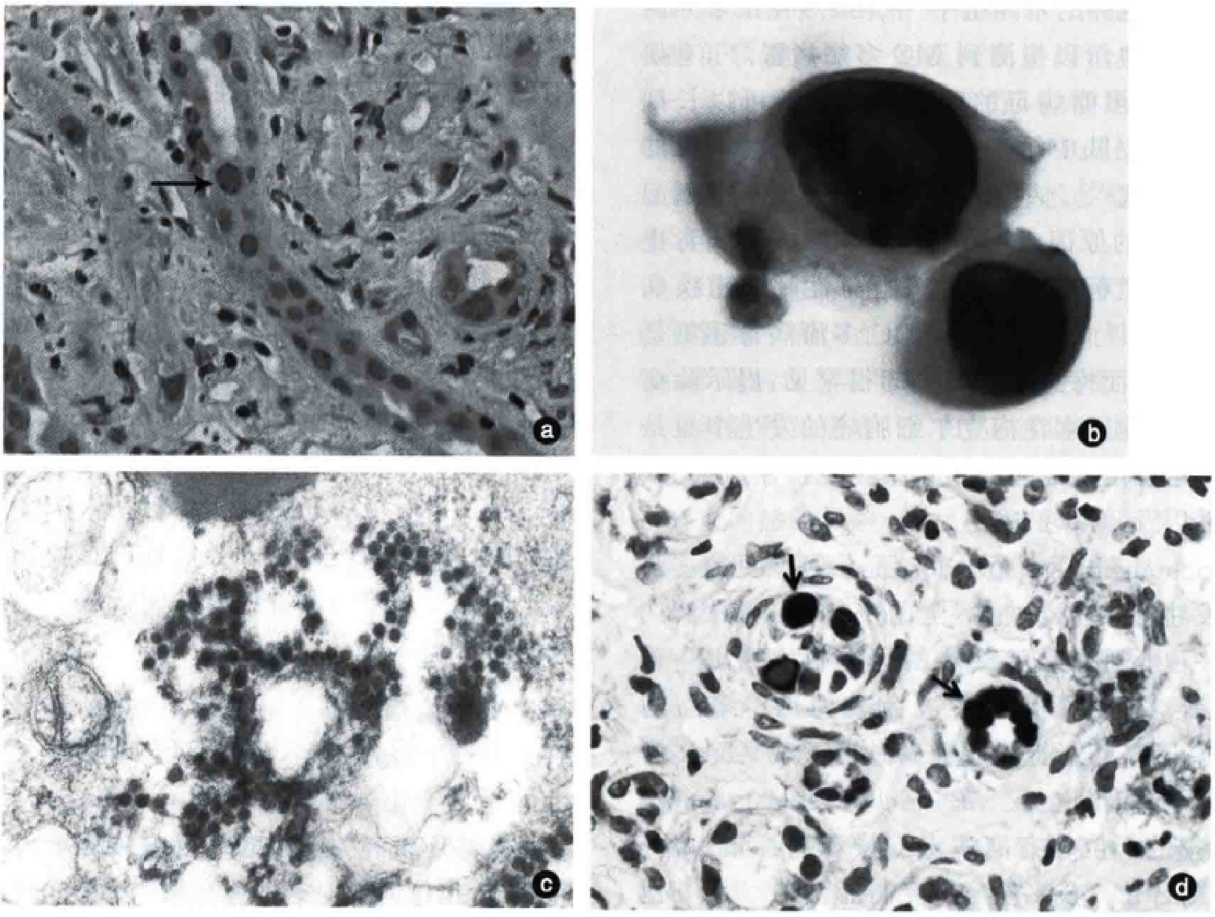


图 108-2 多瘤病毒相关肾病的病理学。a. 显微镜照片:肾脏活检标本的苏木素-伊红染色结果显示集合管上皮细胞核内包涵体(箭头所示)(放大倍数,×200);b. 显微镜照片:多瘤病毒相关肾病患者尿"诱饵细胞"巴氏染色表现出典型的增大的嗜碱性细胞核(放大倍数,×400);c. 肾活检组织电子显微镜下可见典型的直径 40～45 nm 多瘤病毒的病毒颗粒的排列(放大倍数,×12 000);d. 显微镜照片:肾活检标本的免疫染色显示远端小管上皮细胞呈均质 1 型的核内包涵体(箭头所示)。图片由华盛顿大学 Helen Liapis 提供,见彩插

由于大脑活检标本获取的危险性，进行性多灶性白质脑病在死前完成组织的显微镜检查比多瘤病毒肾病少。在大脑活检标本中，进行性多灶性白质脑病出现脱髓鞘病灶，这些病灶内具有巨噬细胞，含嗜碱性或嗜酸性核内包涵体的巨大的少突神经胶质细胞及体积增大、形状不规则的并有多形核的星形细胞，这种病变在皮质下的白质尤为典型（图 108-3）[109-111]。脱髓鞘病变、形状

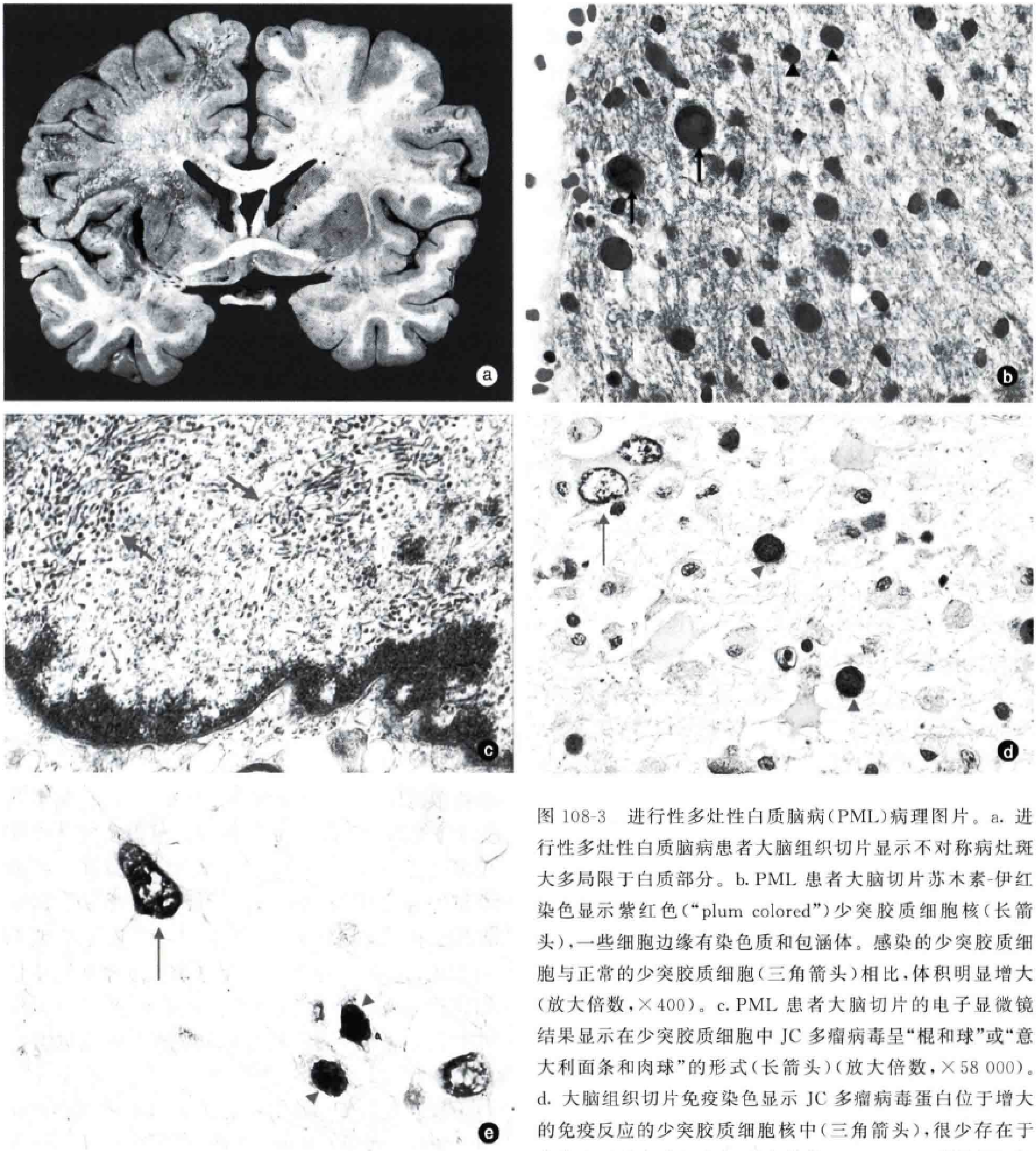


图 108-3　进行性多灶性白质脑病（PML）病理图片。a. 进行性多灶性白质脑病患者大脑组织切片显示不对称病灶斑大多局限于白质部分。b. PML 患者大脑切片苏木素-伊红染色显示紫红色（"plum colored"）少突胶质细胞核（长箭头），一些细胞边缘有染色质和包涵体。感染的少突胶质细胞与正常的少突胶质细胞（三角箭头）相比，体积明显增大（放大倍数，×400）。c. PML 患者大脑切片的电子显微镜结果显示在少突胶质细胞中 JC 多瘤病毒呈"棍和球"或"意大利面条和肉球"的形式（长箭头）（放大倍数，×58 000）。d. 大脑组织切片免疫染色显示 JC 多瘤病毒蛋白位于增大的免疫反应的少突胶质细胞核中（三角箭头），很少存在于非典型星形胶质细胞内（放大倍数，×600）。e. 利用标记的 JC 多瘤病毒探针进行原位杂交，少突胶质细胞呈阳性信号（三角箭头）和一个不典型标记的星形胶质细胞（长箭头）（放大倍数，×1000）。图片由华盛顿大学 Robert Schmidt 提供，见彩插

不规则的并有多形核的星形细胞和巨大的少突神经胶质细胞核组成"经典组织病理学三联征"已被纳入诊断PML的共识性声明[112]。

电镜技术可以用于诊断多瘤病毒相关肾病和进行性多灶性白质脑病。细胞内的多瘤病毒表现为直径40 nm的病毒颗粒，组装于亚晶体阵列或所谓的"棍和球"或"意大利式面条和肉丸"结构中(图108-2和图108-3)[113-115]。在造血干细胞移植患者[116-117]和多瘤病毒相关肾病患者[118]的尿中，电镜下可见细胞外有BK多瘤病毒的病毒颗粒聚集成"Haufen"。在一些梅克尔细胞癌病例中发现了多瘤病毒颗粒，据此电镜可能有助于梅克尔细胞癌的诊断[119]。电镜也能发现Trichodysplasia spinulosa患者组织中的典型多瘤病毒颗粒[89]。

(二)抗原检测

组织切片的免疫组织化学染色是利用抗体和多瘤病毒的抗原发生反应，已经作为诊断多瘤病毒相关肾病[58,114,120-121]和进行性多灶性白质脑病[115,122](图108-2和图108-3)的组织病理学检查的辅助检查。在多瘤病毒相关肾病的病例中，多瘤病毒抗原有助于判断肾病病因是多瘤病毒相关肾病还是排斥反应。商品化的针对SV40大T抗原的抗体最常应用于此目的(供应商见http://www.biocompare.com)。这些抗体与JC多瘤病毒和BK多瘤病毒的抗原有交叉反应，可用于检测发现多瘤病毒，但是不能确定是何种多瘤病毒。目前已有商售的分别针对JC多瘤病毒和BK多瘤病毒VP1蛋白特异性单克隆抗体，可用于确定是何种多瘤病毒。对于Trichodysplasia spinulosa，一种实验室研发的非商品化的免疫荧光测定法已经用于感染组织TS多瘤病毒VP1蛋白的检测[89]。

(三)核酸检测

1. 原位杂交(in situ hybridization, ISH) ISH是一种利用BK多瘤病毒或JC多瘤病毒特异性探针的辅助性组织病理学方法，有时用于多瘤病毒相关肾病和进行性多灶性白质脑病的实验室诊断(图108-3)[65,120,123-125]。增加一个PCR步骤可以提高实验的敏感性[124]。在多瘤病毒相关肾病的病例中，就像使用免疫组织化学染色那样，原位杂交通过BKPyV核酸在病变处的定位有助于区别多瘤病毒相关肾病和排斥反应。目前适用于原位杂交的生物素和地高辛标记的BK多瘤病毒和JC多瘤病毒探针有商品化试剂供应(Enzo Life Sciences, Farmingdale, NY)。

2. 核酸扩增试验(nucleic acid amplification tests, NAATs) NAATs虽然已有特异性分析试剂和仅用于科研的试剂，但目前还没有经美国FDA批准的或放行的任何用于多瘤病毒的检测或定量的试验。因此，实验室只能自行研发他们自己的试验并面对各种各样的问题，包括选择合适的提取法、控制实验中各种生物化学步骤到选择扩增的方法和各种试剂。下文提供了关于多瘤病毒核酸扩增试验NAATs的具体信息。

(四)模板提取

理想的BK多瘤病毒和JC多瘤病毒核酸扩增试验的检测性能特征是不同的。对多瘤病毒相关肾病的检测通常通过定量核酸扩增BK多瘤病毒来进行，该试验必须具有可重复性(结果的曲线变异系数小)，但不要求特别高的敏感性，因为在大多数情况下，低浓度病毒不具有显著的临床意义。相反，由于JC多瘤病毒DNA在脑脊液中的水平较低，为了对进行性多灶性白质脑病的诊断而对脑脊液中JC多瘤病毒进行检测则需要极高敏感性的检测方法。应根据不同的性能标准选择适当的核酸提取方法。对BK多瘤病毒来讲，少数已发表的提取方法的研究表明标准的手动和自动提取方法足以满足临床需求(见下文)。目前尚无关于JC多瘤病毒提取方法的类似研究。由于敏感性对于检测JC多瘤病毒很重要，因此实验室可选择进行JC多瘤病毒不同提取方法有效性评价。但是，由于缺乏JC多瘤病毒颗粒可购到的来源，这种评估会变得复杂，因此需要使用已知含该病毒的患者脑脊液。或者实验室可以研究其他无包膜病毒(如腺病毒)的不同提取方法的效率。

现已发表了一些对从临床标本中提取和纯化BK多瘤病毒DNA的不同方法的效果评估的文章[126-130]。虽然有一项研究提示2个自动化平台从尿中去除PCR抑制物的能力有差异[131]，不同的手工方法之间观察相对含量或出报告时间之间有差异，但总体上，自动化和手工方法检测BK多瘤病毒标本时的差异很小。

由于病毒尿症的水平极高，可能发生的标本之间的交叉污染是在BK多瘤病毒DNA的提取过程中需要关注的一个重要问题。目前无证据显示在一个自动化提取仪中存在交叉污染，提示使用仪器是可行的[132]。如果用于核酸扩增实验的标本量小，则没有必要进行核酸提取。2 μl未处理的尿加到20 μl PCR反应体系对BK多瘤病毒进行定性及定量检测，其结果与使用手工离心柱提取的结果无明显差异[133]。较大的标本量(5 μl)则会产生反应抑制。

(五)内部质量控制

对尿标本进行多瘤病毒的检测时，内部质量控制尤其重要。内部质量控制可用于发现核酸提取过程中产生的问题，如未完全消除扩增抑制因素(尿标本最重要的影响因素)或者核酸提取效率低，但不能区分何种原因所致。化学修饰的无感染性的BK多瘤病毒颗粒可被用于核酸提取过程中的质量控制品，并已经商品化(ZeptoMetrix, Buffalo, NY)。一种由7种抑制剂构成的抑制盘(由被认为是NAAT抑制因子的定量物质所构成)在市场中也可买到(AcroMetrix, Benicia, CA)，可应用于存在已知抑制因子情况下，评估试验的稳定性。

(六)阳性对照和标准品

所有的核酸扩增试验都要求有阳性对照和阴性对照，当进行核酸定量试验时，为建立标准曲线还需要一套已定量的标准品。关于检测多瘤病毒的核酸扩增试验所需的质控品和标准品，已有多种选项可供实验室选择。BK多瘤病毒和JC多瘤病毒质控品在市场上可买到[完整病毒和编码病毒全基因组的质粒(American Type Culture Collection, Manassas, VA)、定量化病毒DNA(Advanced Biotechnologies, Inc., Columbia, MD)和定量灭活的BK多瘤病毒颗粒(ZeptoMetrix)]。2016年，英国国立生物标准与控制研究所提供了WHO关于BK多瘤病毒的国际标准(www.nibsc.org)。没有用于新鉴定的多瘤病毒的商品化材料。对于这些病毒，实验室可以鉴定阳性标本以用于克隆病毒DNA并制备对照和标准品，也可与本领域内研究人员联系获取相关材料。

(七)核酸扩增方法

病毒诊断的常规实验室方法，如细胞培养、快速抗原检测和血清学方法在人类多瘤病毒实验室诊断方面有明显的缺点，而其他检测方法，如免疫组织化学染色、电子显微镜和原位杂交，传统上不在微生物学实验室进行。因此，对于大多数微生物诊断实验室，核酸扩增试验将成为临床标本中多瘤病毒检测和(或)定量的方法。对于BK多瘤病毒要求定量方法[134]。

BK多瘤病毒和JC多瘤病毒的核酸扩增试验的设计是难点，是由于种特异性序列的变化。BK多瘤病毒亚型之间的序列差异会影响PCR检测。最近的一项研究使用7种不同的方法检测2个不同的校准品，发现定量结果具有明显的差异，出现这种差异除了与校准品有关外，更重要的是与引物和探针的设计密切相关。发生错误的最重要的原因是病毒与扩增/检测的寡核苷酸之间存在核苷酸错配，尤其是BK多瘤病毒亚型Ⅲ和Ⅳ[135]。偏重检测Ⅰ亚型的方法未能检测到某些样本中含有的Ⅲ亚型或Ⅳ亚型病毒。使用2组修饰过的引物/探针能够较好地对所有亚型进行准确的定量检测。另有一项研究发现，当使用5种文献报道的实时PCR的引物和探针与716个BK多瘤病毒株序列进行序列比对时，发现最高达31%的病毒株有明显的核苷酸不匹配，以亚型Ⅳa、Ⅳb和Ⅳc最多[136]。一项研究详细介绍了采用简并碱基设计引物和探针以提高对BK多瘤病毒序列变异株的检测[137]。实验室应警惕扩增曲线变平，这可能表明标本中病毒在引物或探针核苷酸结合处序列的多态性，有可能影响病毒载量测定的准确性。

WHO可提供国际标准是一项重要的进步，使得实验室间实现标准化，并以国际单位报告结果，而不是拷贝数。以最近的一份报告为基础提出了一个值得注意的警示，此报告表明WHO标准由多个病毒群体组成，包括一些BKPyV大T抗原部分缺失毒株，而这些区域是一些PCR测定的靶向区域。通过使用该标准品进行定量分析，此缺失可能会导致高估了被检测的BKPyV水平[138]。

表 108-3 在美国用于 JC 多瘤病毒和 BK 多瘤病毒检测的商品化核酸扩增试剂

病毒	产品(生产厂家)	评价(监管现状)[a]
BK 多瘤病毒	BK 病毒 r-基因引物/探针(bioMérieux,Durham,NC)	用于以大 T 抗原序列为靶点的 5′核酸酶实时分析(RUO)
	BK 病毒 R-基因定量试剂盒(bioMérieux)	利用 5′核酸酶实时分析对 BK 多瘤病毒进行定量检测。试剂盒包括提取、抑制物处理、阳性和阴性对照(RUO)
	BKV 引物对(Focus Diagnostics,Cypress,CA)	利用 FAM 标记的前向引物扩增 VP2 基因片段的实时试验(ASR)
	MGB Alert BK 多瘤病毒引物和探针(ELITechGroup, Princeton,NJ)	分别包装的引物和 MGB 探针,能进行熔解曲线分析,以 VP1 区序列为靶点(ASR)
	MultiCode BK 多瘤病毒引物(Luminex,Madison, WI)	一组以 VP3 为靶点的引物;与合成碱基共同使用,用于扩增和实时检测(ASR)
JC 多瘤病毒	JC 病毒 r-基因引物/探针(bioMérieux)	用于以大 T 抗原序列为靶点的 5′核酸酶实时分析(RUO)
	MultiCode JC 病毒引物(Luminex)	一组以 VP3 为靶点的引物;与合成碱基共同使用,用于扩增和实时检测(ASR)
JC 多瘤病毒/BK 多瘤病毒	JC/BK 通用(bioMérieux)	通过 PCR 扩增、产物与微孔板包被的探针进行杂交从而扩增和区分 JC 多瘤病毒和 BK 多瘤病毒(RUO)

注:[a]ASR. 分析用特定试剂;FAM. 6-羧荧光素酰胺标记的 DNA 合成剂;MGB. 小凹槽结合物;RUO. 仅用于研究使用

序列变异性可能也影响 JC 多瘤病毒的核酸扩增试验。假阴性核酸扩增的结果(依靠扩增另一靶点证实)已有报道,该患者患有进行性中枢神经疾病,其大脑活检组织在电镜下发现类似多瘤病毒的病毒颗粒[139]。在实验的设计阶段要十分注意假阴性结果的问题,检测范围宽的实时 PCR 试剂和采用变异性较小的靶序列的试剂已有报道[135-137,140-141]。此外,实验室应定期将引物和探针与新发现的序列进行比对以确保其可以用来检测新发现的病毒。编写本文时,尚无有关 JC 多瘤病毒检测方法敏感性对比的研究结果发表。

PCR 方法已被研究证实可以用于新发现的多瘤病毒检测,这些病毒相对新,对其序列变异信息了解甚少。已有研究报道了将传统 PCR 方法[32,35,142]和 TaqMan 探针实时 PCR 方法[36,39,143-144]用于 WU 多瘤病毒和 KI 多瘤病毒的检测。常规 PCR 实验[83]和 TaqMan 探针实时 PCR 分析[41-42]也可用于 MC 多瘤病毒检测。PCR 方法也可用于许多新发现的人类多瘤病毒的检测,包括多瘤病毒 6 和多瘤病毒 7[85]、TS 多瘤病毒[87,89]、MW 多瘤病毒[5-6]、STL 多瘤病毒[13]、多瘤病毒 9[7,145]和多瘤病毒 12[12]。

七、分离和培养操作规程

JC 多瘤病毒和 BK 多瘤病毒可以通过细胞培养进行分离和增殖[146-148],但目前这些方法对实验室诊断多瘤病毒的感染起不到作用。JC 多瘤病毒有严格的宿主范围(仅在人类细胞),可以在原代胚胎细胞、人脑源性细胞(特别是星形胶质细胞和少突胶质细胞前体细胞)和永久细胞系 SVG 中生长。与 JC 多瘤病毒相比,BK 多瘤病毒的宿主范围广,可以在相似的原代细胞、原代人胚胎肾和肺细胞、人包皮成纤维细胞和传代细胞系(HeLa 细胞系和猴细胞系,如 CV-1 和 Vero)内生长。2 种病毒所致细胞病变包括细胞半透明化、核增大及单层细胞不断脱落。往往需要数周多次盲传才能繁殖成功。大多数病毒保持与细胞相连的状态(即一直存在于细胞内)。

八、血清学试验

人类多瘤病毒血清学试验主要是用在一些特殊的临床病例的危险评估,除此之外是作为血清流行病学调查研究的手段。大多数实验方法是由实验室研发的。对于 JC 多瘤病毒和 BK 多瘤病毒,已有两种类型的血清学试验被报道,包括血凝抑制试验(hemagglutination inhibition,HAI)和使用粗制抗原或病毒样颗粒(virus-like particles,VLPs)的酶免疫测定试验(enzyme immunoassays,EIAs)。血凝抑制试验抗体检测利用了特异性抗病毒抗体具有抑制 JC 多瘤病毒和 BK 多瘤

病毒的病毒结构蛋白 VP1 介导的人类红细胞之间凝集反应的功能[148]。基因工程细胞系能够生产足够的 JC 多瘤病毒抗原，这使得建立检测 JC 多瘤病毒和 BK 多瘤病毒抗体的酶免疫测定试验成为可能[149]。对血凝抑制试验和酶免疫试验进行比较，结果显示两者的抗体效价在统计学上显著相关，但酶免疫测定试验的抗体效价较高[150]。病毒样颗粒也被用于酶免疫测定试验中抗体的检测。病毒样颗粒是保留了完整病毒颗粒所有抗原性的空的病毒颗粒。当病毒衣壳蛋白在一些系统中表达时，病毒样颗粒会自发形成，其常被作为酶免疫测定试验的抗原来源，因为其含有天然构象决定簇，当使用其他形式的病毒抗原时，这些结构可能会丢失[151]。可同时检测 13 种不同人多瘤病毒抗体的测定法已有报道[152]。

尽管 JC 多瘤病毒和 BK 多瘤病毒关系密切，但这 2 种病毒的抗原表位产生的人类抗体免疫反应之间无交叉反应，抗体试验可以用于这 2 种病毒感染的鉴别[150]。相反，对猴病毒 40 的血清学反应很大程度上是由于与 BK 多瘤病毒之间存在交叉反应[151,153-154]。近年新发现的多瘤病毒已经使得多瘤病毒血清学变得复杂，也使得一些多瘤病毒血清学实验结果如何解释的问题更为突出。更复杂的是，人类血清所含的抗体可以和动物源性多瘤病毒反应，提示多瘤病毒可能从动物传播到人类。考虑到这种情况及会有更多的多瘤病毒被发现，建议在解释人类多瘤病毒血清学试验结果时应谨慎。最近的文献综述对人类多瘤病毒的血清学相关问题进行了全面深入的论述[47]。

对于 BKPyV，研究表明肾脏供体 BKPyV 抗体滴度与移植受者感染之间呈正相关[62]。尽管此发现是令人震惊的，但目前尚未应用于临床。对于正在考虑使用那他珠单抗或其他免疫抑制性单克隆抗体治疗的患者，JCPyV 抗体检测可评估其患 PML 的风险[155-157]。在撰写本文时，商品化试剂仅限于 Focus Diagnostics(Cypress,CA)生产的分级 JCV 抗体试验，获得 FDA 放行。该试剂盒是 ELISA 方法，以 VLP 作为抗原，以比值作为其结果，结果>0.4 为阳性。

九、抗病毒药物敏感性

对于进行性多灶性白质脑病，许多抗病毒药物已经被验证，包括：①西多福韦(cidofovir)，一种无环核苷磷酸酯；②brincidofovir(CMX-001)，一种西多福韦的磷脂衍生物；③拓扑替康(topotecan)，一种 DNA 拓扑异构酶Ⅰ的抑制剂；④来氟米特(leflunomide)，一种具有抗病毒特性的免疫抑制剂；⑤阿糖腺苷(ara-A)和阿糖胞苷(ara-C)，人工合成的抑制病毒 DNA 聚合酶类的核苷类药物；⑥α 干扰素[158]。根据证据显示在中枢神经系统 JC 多瘤病毒通过 5-羟色胺 2A 受体感染细胞，已经引起人们对这类药物的研究兴趣，如利培酮(risperidone)能与该受体结合，且已被批准用于某些神经精神疾病的治疗[159]，另有研究认为，JC 多瘤病毒感染细胞时不依赖 5-羟色胺受体[160]。一项研究筛查了 2000 种目前批准使用的药物，发现抗疟疾药物甲氟喹(mefloquine)在体外具有抑制 JC 多瘤病毒的作用[161]。遗憾的是，在使用甲氟喹治疗进行性多灶性白质脑病的临床试验中，由于中期分析数据显示药物对疾病没有任何疗效，试验在初期即被迫终止[162]。一些抗病毒药物对 JC 多瘤病毒的抗病毒活性在体外研究已经被证实，且在临床病例报道中常有鼓舞人心的结果。然而，因为进行性多灶性白质脑病是一种罕见的疾病，且大多数患者是 HIV 感染患者，正在接受的抗 HIV 治疗可能产生潜在的混杂效应，研究因此受到阻碍，很难评估所研究药物的疗效。遗憾的是，多数针对进行性多灶性白质脑病抗病毒治疗的临床研究未能达到一致的疗效[163-167]，目前还没有经 FDA 批准的药物用于治疗这种毁灭性的疾病。当前的治疗方法包括用于 HIV 感染患者的优化的 HAART 法，目的是提高 $CD4^+$ 细胞数和降低 HIV RNA 水平[50]。对于非 HIV 感染的患者，推荐使用能逆转或改善患者免疫抑制状态的方法进行治疗[163]。虽然不是一种抗病毒治疗，去除免疫调节剂如那他珠单抗可以通过血浆置换来达到。这可能反过来引起免疫重建炎症综合征，该病本身具有危险性，通常有后遗症，但能够提高生存率[55]。

许多可能对进行性多灶性白质脑病具有抗病毒作用的药物也被用于研究治疗 BK 多瘤病毒引发的多瘤病毒相关肾病，也偶尔被用于出血性膀胱炎。除这些药物外，对氟喹诺酮类抗生素和静脉注射免疫球蛋白也进行了研究。与治疗进行性多灶性白质脑病的抗病毒药物的进展状况类似，

目前没有FDA批准的药物用于治疗BK多瘤病毒引发的疾病。抗病毒药物的缺乏是由许多因素造成的,包括必须有前瞻性的随机对照研究,很多药物表现出来的肾毒性,以及干扰因素,如有移植受体者表现出BK多瘤病毒感染时,几乎都以改善免疫功能的方法来进行治疗,具体做法是通过某种形式将免疫抑制的水平(强度)降低。有一篇文献综述汇总了多瘤病毒相关肾病抗病毒治疗的研究情况,发现在27篇论文中有184例患者接受西多福韦治疗,在18篇论文中有189例患者接受来氟米特治疗,在2篇论文中有14例患者接受喹诺酮类药物治疗,由此研究者便得出对多瘤病毒相关肾病进行抗病毒治疗的效果不一致的结论[168]。目前,一项关于使用核苷类似物治疗BK多瘤病毒感染的Ⅰ/Ⅱ期临床试验研究正在进行中[169],但在这些研究或将来的研究能证实特定抗病毒药物的疗效之前,目前,治疗多瘤病毒相关肾病的主要治疗方法仍是减少免疫抑制,虽然多瘤病毒相关肾病患者有损失移植物的风险,仍可使用一些抗病毒疗法[170-172]。

十、结果的评价、解释和报告

目前实验室对多瘤病毒相关肾病的检测主要是监测患者尿和血液中BK多瘤病毒的水平,当病毒尿症或病毒血症中病毒含量达到预示病情有进展的水平时,则采取措施减少免疫抑制[134]。BK多瘤病毒病毒尿症检测的阴性预测值较高,而对于多瘤病毒相关肾病的阳性预测值是变化的,当病毒尿症持续处于高水平时($>10^7$拷贝/ml),阳性预测值最高可达到67%[172]。出现持续高水平的BK多瘤病毒尿症,往往患者紧接着会出现病毒血症。已发现大多数患有多瘤病毒相关肾病的患者出现BK多瘤病毒血症,病毒血症对于预测疾病发展为多瘤病毒相关肾病的阳性预测值可达到60%[172]。在2013年发布的一项管理指南中,关于成人实体器官移植后BK多瘤病毒感染的管理建议在移植后的前2年每1~3个月定期检测尿或血浆中BK多瘤病毒复制,以后每年1次直至移植后第5年。可以通过PCR或细胞学检查寻找诱饵细胞进行尿筛查。如2种方法任何一种阳性,应通过PCR测试血浆。另一种替代方法是直接筛查血浆。血浆病毒血症水平>10 000 DNA拷贝/ml已经被作为肾活检和(或)减少免疫抑制药物的指征[134]。但是,由于此建议是在国际标准可用之前提出的,由于检测方法间的易变性而可能难以应用。

这些建议有助于指导核酸扩增试验的使用及其结果的解释。然而,由于缺乏国际认可的用于实验室间校准的标准品及检测方法,可能无法优化检测和定量所有BK多瘤病毒的病毒株,BK多瘤病毒定量结果的实验室间差异很大,因此这些建议实施起来很复杂。例如,2008年,美国病理学会将4份能力测试样本送到进行BK多瘤病毒定量检测的实验室,比较不同实验室不同检测试验的结果。所有48家实验室(38家使用自行研发的检测方法,10家使用商品化试剂盒)对一份不含BK多瘤病毒DNA的标本均报告结果为阴性。当检测BK多瘤病毒阳性标本时,结果就不那么理想了。有一份标本在41家实验室的检测结果差异最大,统计结果如下:平均值为700 946拷贝/ml,标准差(SD)为1 729 692拷贝/ml,变异系数(CV)为246.8%,数据范围为129~10 400 000拷贝/ml。35家实验室也报告了这份标本经对数转换的数据,统计结果如下:平均值为4.806,标准差(SD)为1.231,数据范围为1.02~6.51。变异系数最小的BK多瘤病毒阳性标本的检测结果如下:平均值为277 288拷贝/ml,标准差(SD)为284 990,变异系数(CV)为102.8%,数据范围为7 800~945 000拷贝/ml(所有资料的使用均获得美国病理学会的允许)。显然,BK多瘤病毒定量结果存在明显的实验室间易变性。就像其他病毒定量检测采用国际标准一样,希望世界卫生组织定量标准的应用也可改善BK多瘤病毒实验室间差异[173]。

为更好地实现实验室间标准化,鼓励实验室按照国际标准校准其BK多瘤病毒测定法。至少要等到根据国际标准提出可靠建议为止,鼓励采用其他一般原则,包括在实验室与医生之间进行认真协作以使实验室内易变性最小化,建立用于调节免疫抑制方案的内部病毒尿症和病毒血症阈值。这些额外的努力显然都是值得的,因为已经证明试验阈值的成功实施可显著降低多瘤病毒相关肾病的发生率[170,174]。

为了得到关于感染过程的准确结论,患者应尽可能在同一机构进行监测。考虑到不同实验室

间 BK 多瘤病毒定量结果可能存在差异，因此不同实验室的连续监测结果很难解释。关于这个问题实验室工作人员应对医生和移植协调人员解释清楚。

对于疑似多瘤病毒相关肾病，但 BK 多瘤病毒滴度为阴性或很低的患者，应考虑假阴性的可能性，可能由于实时 PCR 的引物或探针与病毒之间序列的不匹配所致。另外，也可能是 JC 多瘤病毒引起的，在这种情况下，最好通过组织学方法来确定活检组织中该病毒的存在或者检测血浆标本。尿中该病毒的排毒很常见，可能并不能表明致病性病原体存在。遗憾的是，还未出台解释外周血中 JC 多瘤病毒水平的参考指南。

骨髓移植接受者的尿进行核酸定量分析有利于预测病情的发展或诊断出血性膀胱炎。由于 BK 多瘤病毒感染，出血性膀胱炎患者可出现高水平的病毒尿症（$>1\times10^9$/ml）[71,175]，阴性结果则提示疾病是由于其他原因导致。

接受骨髓移植的患者尿中经常排出 BK 多瘤病毒，并且没有参考指南给出预测或诊断 BK 多瘤病毒感染的阈值，因此，对于 BK 多瘤病毒引起的病毒尿症的解释是很复杂的。研究得到了多变大的数据。有一项研究建议当病毒水平达到或超出 $10^9\sim10^{10}$ 拷贝/ml 或者增长量的对数值达到或超出基线水平的 3 $\log_{10}$ 时，提示 BK 多瘤病毒可能是病因[70]；另一研究发现 BK 多瘤病毒引起的病毒血症的病毒水平超过 10^4 拷贝/ml 时，与出血性膀胱炎的发生有关[70]；然而，在另一类似的研究中没有发现这种相关性[71]。所有未溯源到国际标准定量的阈值建议适用性都是有限的。

血清学试验和细胞培养对进行性多灶性白质脑病的诊断基本没有作用。大多数人到了成年期，血清 JC 多瘤病毒抗体呈阳性；细胞培养需要特殊的细胞及长时间的培养，而且此方法并不敏感。因此，进行性多灶性白质脑病的首选诊断方法是 JC 多瘤病毒特异性核酸检测。脑脊液中 JC 多瘤病毒 DNA 含量明显异常，结合适当的影像学检查及病史，强烈提示进行性多灶性白质脑病。脑脊液 JC 多瘤病毒核酸检测的敏感性为 42%～100%，大多数情况为 70%～80%，特异性为 92%～100%[176]。研究证实，进行性多灶性白质脑病患者 JC 多瘤病毒 PCR 检测结果的假阴性可能是由于引物和探针与标本中的病毒相应序列之间的不匹配所致[139,177]。此外，有研究发现在实行 HAART 治疗的年代，PCR 敏感性降低（HAART 治疗前敏感性为 89.5%，HAART 治疗后敏感性为 57.5%，阴性预测值从 98% 降至 89%）[178]。这些发现强调了 JC 多瘤病毒阴性并不能排除进行性多灶性白质脑病的存在这一事实。当怀疑患者为进行性多灶性白质脑病病例时，如果初次检测结果为阴性，可以用不同的核酸检测方法对脑脊液进行复查。值得注意的是，那他珠单抗诱导的进行性多灶性白质脑病患者采用血浆置换法去除药物，脑脊液中 JC 多瘤病毒 DNA 可能持续数月甚至数年[179]。

由于进行性多灶性白质脑病具有破坏性，实验室检测方法致力于明确患者发生进行性多灶性白质脑病的风险是否在增加，或者对已确诊患者提供预后预测。对 HIV 感染者及非 HIV 的免疫抑制患者（包括进行那他珠单抗免疫调节治疗的患者）的研究发现，仅对尿和血液样本进行一次 JC 多瘤病毒 DNA 定性检测对识别进行性多灶性白质脑病高危人群并无帮助，因此并不推荐使用[180-181]。HIV 阳性患者中持续的病毒尿症和尿病毒载量不断增高与进行性多灶性白质脑病的发生有相关性[182]。然而，一项大规模研究对 1397 例接受那他珠单抗治疗的多发性硬化患者超过 12 000 份的尿和血液标本进行 JC 多瘤病毒 DNA 检测，结果如下：①在治疗患者中，JC 多瘤病毒病毒血症的患病率很低（<1%），结果与未接受治疗的健康对照组相似；②检测到 JC 多瘤病毒病毒血症与进行性多灶性白质脑病的发生无相关性；③基线水平和治疗 48 周后患者的 JC 多瘤病毒病毒尿症的患病率都很高（可达 25%）。从而得出结论，对该人群进行病毒尿症和病毒血症检测对确定这组人群的进行性多灶性白质脑病的患病风险无帮助[183]。

采用定量 PCR 方法检测脑脊液 JC 多瘤病毒载量对进行性多灶性白质脑病患者的疾病进展的预后监测起到潜在的帮助作用。然而，由于研究规模小并且缺乏标准化的 JC 多瘤病毒核酸定量检测方法，很难制定脑脊液病毒载量阈值的参考指南。不同的研究粗略估计，当患者脑脊液 JC 多瘤病毒载量达到 $10^4\sim10^5$ 拷贝/ml 时，是多灶性白质脑病患者的病情进展迅速与那些病情平稳或病情进展非常缓慢的分水岭[181,184-186]。

Focus Diagnostics 公司研发的商品化 Stratify JCV 试剂盒被应用于检测接受那他珠单抗治疗的多发性硬化症患者血清 JC 多瘤病毒感染情况。研究显示 831 例多发性硬化患者中 JC 多瘤病毒的血清阳性率为 54%，后来发展为进行性多灶性白质脑病的 17 例患者均为 JC 多瘤病毒血清阳性[155]。在同一项研究中，还报道了在 204 例血清阴性患者中检测出 5 例呈病毒尿症阳性，从而得出 JC 多瘤病毒血清假阴性率为 2.5%。但是，另一项研究显示，接受那他珠单抗治疗的患者 JC 多瘤病毒假阴性率更高，17 例 JC 多瘤病毒血症患者的假阴性率高达 35%。提示尽管 JC 多瘤病毒血清学的检测有助于评估进行性多灶性白质脑病的患病风险，但需要建立其他风险评估措施，作为血清学试验的补充，同时应谨慎解释 JC 多瘤病毒血清学实验结果[187]。

当前的建议要求在考虑使用那他珠单抗治疗的患者中使用 Stratify 试验进行风险评估。在该试验中，＜0.2 的指数值被认为是阴性，＞0.4 为阳性。0.2～0.4 认为是中介，再进行确证性抑制试验。JC 抗体阴性或抗体指数＜1.5 的阳性患者应在那他珠单抗治疗期间每 6 个月复查一次。那些在基线或复查中抗体指数＞1.5 呈阳性的患者发生进行性多灶性白质脑病的风险增加，建议增加脑部 MRI 扫描频次并考虑终止那他珠单抗的治疗[188]。

目前，对于新发现的人类多瘤病毒的实验室检测仍处于研究阶段，因此无法对这些病毒的检测结果做出有意义的解释。

参考文献请扫二维码查阅

第109章 细小病毒B19和博卡病毒

KEVIN E. BROWN

（侯铁英、邸玉玮 译；陶传敏、王辉 审校）

一、分类学

细小病毒是小的（直径约 22 nm）、无包膜二十面体病毒，包含线性单链 DNA 基因组。它的名字“细小”来源于拉丁文“*parvum*”。细小病毒科（Parvoviridae）是已知的感染哺乳动物细胞的最小 DNA 病毒之一，分为 2 个亚科，细小病毒亚科（Parvovirinae）和浓核病毒亚科（Densovirinae），分别感染脊椎和无脊椎动物细胞。目前根据脊椎动物病毒（细小病毒亚科）的可读框数量、转录地图（transcription map）、自主复制或辅助病毒复制、序列同源性等因素分为 8 个属，包括阿留申病毒属（*Amdoparvovirus*）、埃文细小病毒属（*Aveparvovirus*）、博卡细小病毒属（*Bocaparvovirus*）、*Copiparvovirus*、依赖性细小病毒属（*Dependoparvovirus*）、红细胞细小病毒属（*Erythroparvovirus*）、原细小病毒属（*Protoparvovirus*）和四细小病毒属（*Tetraparvovirus*）[1]。

已知至少 5 种不同的细小病毒感染人类。细小病毒 B19（B19V）研究得最透彻，为红细胞细小病毒属的模式种。其他病毒包括人博卡病毒（博卡细小病毒）、PARV4（四细小病毒）、人布法病毒（原细小病毒）和非致病的腺相关病毒（依赖性细小病毒）。在人类粪便中也发现了托萨病毒（Tusavirus）（原细小病毒），但还不知道它是否是人类病毒。

二、细小病毒 B19

（一）病原体的描述

B19V 具有细小病毒科成员的典型特征：病毒颗粒无包膜，直径为 15～28 nm，呈对称二十面体（图 109-1）。病毒颗粒可通过主要病毒受体，P 样血型物质，也称为红细胞糖苷酯使红细胞凝聚[2-4]。

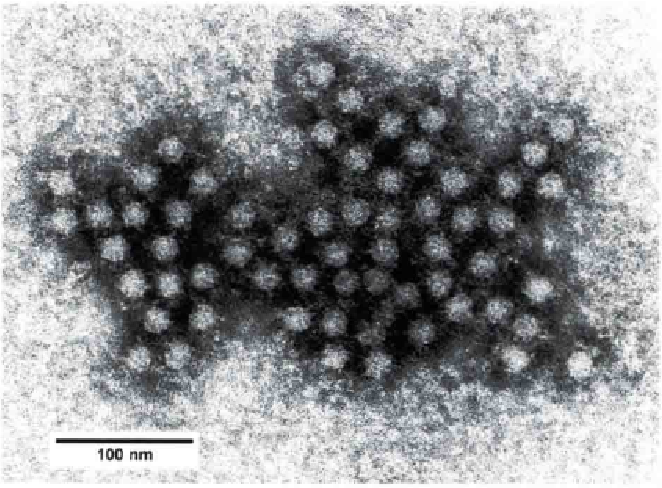


图 109-1 B19V 在免疫电子显微镜下的形态，表现为典型的直径 22 nm 颗粒，在人多克隆抗血清中聚集成簇。图片由 Hazel Appleton 提供

病毒基因组是具有 5596 个核苷酸的单链 DNA，两端具有长末端反向重复序列。整个基因组包括 2 个大可读框（ORFs），左 ORF 编码非结构蛋白（nonstructural protein，NS），右 ORF 通过选择性剪切编码 2 种衣壳蛋白，即 VP1 和 VP2。

B19V 毒粒有 60 拷贝衣壳蛋白，约 95％是 VP2，5％或更少是 VP1[5]。VP2 可在 B19V 病毒 DNA 缺如的情况下自我装配为病毒样颗粒（VLPs），病毒衣壳形成不需要 VP1[6-7]。虽然有报道 B19V 有 3 个不同的基因型，但由于血清学交叉反应，实际只有一种血清型。

1985 年，这种病毒正式被鉴定为细小病毒科成员之一，国际病毒分类学委员会推荐命名为

B19V以避免与其他病毒如人乳头瘤病毒等混淆。它被归类为红细胞病毒属，细小病毒B19(正式缩写为B19V)[1]。

(二)流行病学及传播

B19V感染在人类中很常见，虽然在不同国家略有差异[8]，但在约50%的15岁青少年及80%老年人群中都能检测到IgG[9-10]。在温带气候感染常发生于冬末、春季及初夏。每3～5年感染率有所增加，与B19V感染的相应临床表现增加相吻合，主要为一过性再生障碍性危象(transient aplastic crisis，TAC)、感染性红斑(erythema infectiosum)[11]。

病毒非常容易通过呼吸道密切接触传播。有一项研究显示，从有症状者到家庭中易感接触者(IgG阴性)的继发感染发生率最高达50%[11]。最高继发感染率、血清阳性率、年度血清阳转率出现于与幼儿密切接触的工作人员中，例如，日托或学校的工作人员[10-12]。

感染性病毒在血清里能被检测到，可以通过血液或血液制品传播。虽然在不到1%的献血者中可检测到低水平B19V DNA[13]，通过某一份血液或血小板制品感染B19V的病例鲜有报道，但通过混合的血液制品传播却常见。欧洲及北美现在要求对所有的成分输血的混合血浆制品进行高滴度的细小病毒DNA筛查，把通过血液制品传播B19V的风险降至最低。

目前尚未研制出针对B19V的疫苗。尽管表达在昆虫或酵母细胞中的B19V病毒样颗粒都具有高度免疫原性[14-15]，Ⅰ期临床实验的结果看起来也很有希望，然而，最近一次更大规模的临床试验因为3个受试者出现不明原因皮肤红疹而被迫中止[16]。

(三)临床意义

B19V主要感染红系祖细胞，诱导细胞凋亡，中止红细胞生成。因此，感染症状与红细胞生成明显减少及针对感染的免疫反应有关，与许多病毒感染不同，B19V感染者的主要临床表现因其自身的免疫学和血液状态不同而有很大的不同(表109-1)。

表109-1 与B19V感染相关的临床疾病和诊断方法

感染者	疾病表现	IgM	IgG	PCR	定量PCR[a]
健康儿童	第5病	阳性	阳性	阳性	>10^4 U/ml
健康成人(常为女性)	多关节症状	发病3个月内阳性	阳性	阳性	>10^4 U/ml
红系增加的患者	一过性再生障碍性危象	阴/阳性	阴/阳性	阳性	常>10^{12} U/ml，但迅速下降
免疫缺陷或免疫正常的患者	持续贫血/单纯红细胞生成障碍	阴/弱阳性	阴/弱阳性	阳性	常>10^{12} U/ml，但未经治疗时可>10^6 U/ml
胎儿(<20周)	胎儿水肿/先天性贫血	阴/阳性	阳性	阳性(羊水或组织)	NA

注：[a]U. 国际单位(1 U=1 genome)；NA. 不适用

1. 健康个体：正常免疫反应 虽然大部分B19V感染者可能无明显症状，B19V感染主要表现为感染性红斑，即“第5病”，因特征性的面部红疹，也被称为“掌掴病”。在2天或5天的非特异性症状如发热、寒战、肌肉疼痛后(图109-2A*)，特征性的掌掴样红疹出现。接着1～4天，躯干和四肢出现红色丘斑疹，因红疹产生的原因是免疫反应，其时程与抗体反应的检测结果具有相关性。当躯干和四肢的红疹渐渐消退时，呈典型的“花边”样表现。红疹出现的形式多种多样，B19V感染患者偶尔会出现淤血性红疹、丘疹样紫癜及“手套及袜套”综合征[17](虽然这在感染后的病毒血症期更常见，但不是原始免疫反应介导的症状)。典型的“掌掴”状红疹在儿童中比成人更常见，第二阶段的出疹从易忽略的微弱红斑到较严重的红疹各有不同，可以短暂出现或1～3周中反复出现。

*译者注：原著引用其他著作图，未经原作者授权翻译，故此保留原图

对于儿童，B19V 感染通常很轻微且持续时间短。然而在成人，特别是女性，最高达 50%的患者出现主要累及手和脚小关节的对称性关节病[18]。关节症状一般持续 1～3 周，有 20%的女性能迁延或者反复至>2 个月甚至数年。若患者没有红疹史，可能与急性类风湿关节炎混淆，因 B19V 感染还与短暂性类风湿因子生成相关[19]。有研究推测类风湿关节炎的进程中(起始和永久性关节炎)涉及 B19V 感染，引起关节损伤[20]，但这样的结果还没有被其他研究团队重复出来证实。相反，常常在类风湿关节炎、慢性关节病，以及对照人群的关节滑液中都能检测出 B19V DNA，B19V 在经典的侵蚀性类风湿关节炎中似乎不起作用。B19V 与青少年风湿性疾病的相关性已经较明确[21]，但 B19V 是疾病的病因还是很多的潜在触发因素之一尚不清楚。

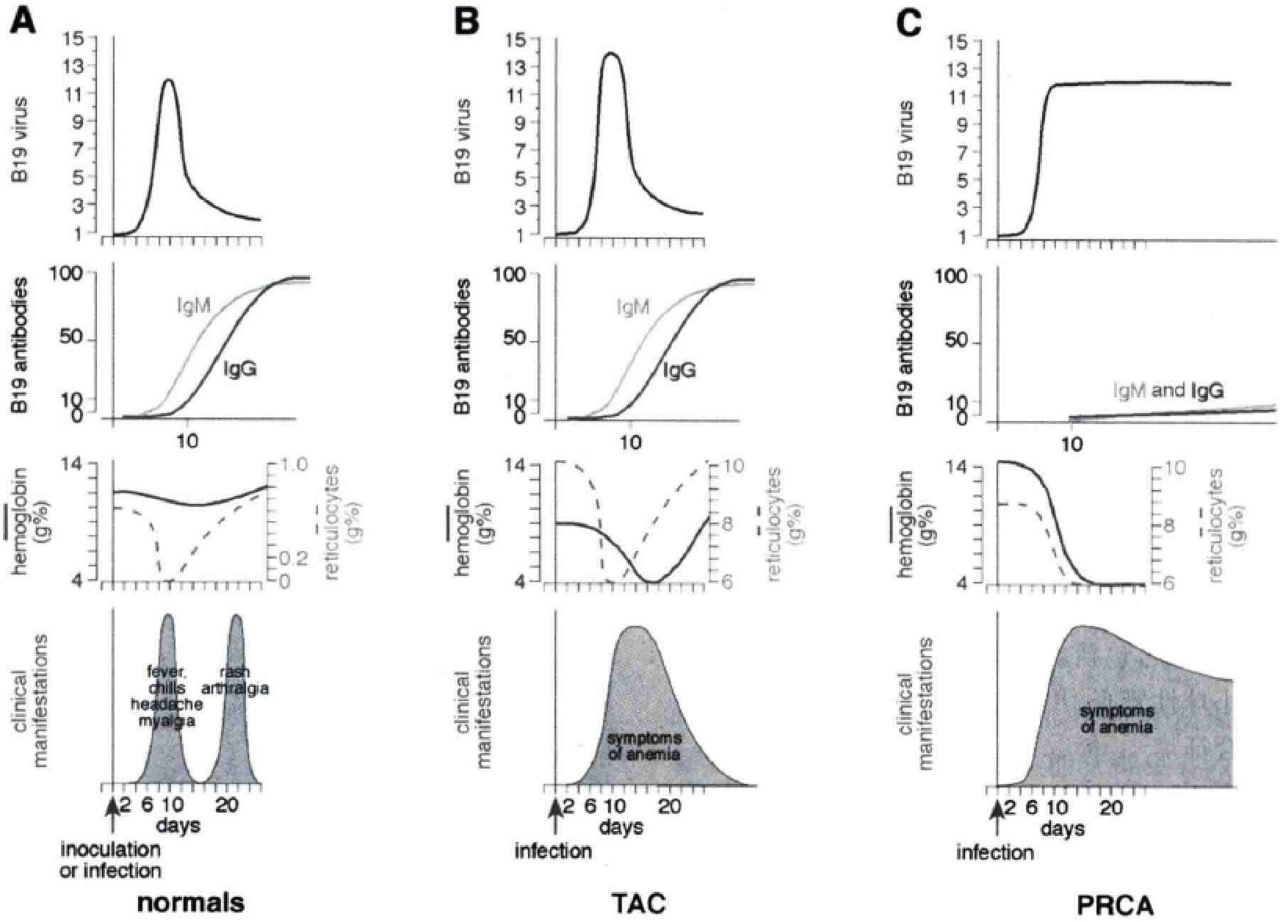


图 109-2　Time course of B19 infections in healthy individuals (A), patients with TAC (B), and immunosuppressed patients (C). PRCA, pure-red-cell aplasia. Figure reprinted with permission from New England Journal (350:586-597, 2004)

2. 红细胞生成增加的患者　B19V 感染引起的红细胞生成突然停止称为 TAC(图 109-2B)，TAC 常出现于多种潜在的溶血性疾病患者中，包括遗传性球形红细胞增多症、地中海贫血、红细胞酶异常如丙酮酸激酶缺乏症、自身免疫性溶血性贫血等[22]。即使在血液系统正常的个体，出现急性贫血或红细胞计数降低也有报道[23-24]。其他血细胞系也可能受影响，出现不同程度嗜中性白细胞减少、血小板减少、短暂性全血细胞减少[22]。很少数患者可表现为瘀点或紫癜样皮疹，一些特发性血小板减少性紫癜[25]和过敏性紫癜病例[26]也与 B19V 感染有关。

B19V 感染虽为自限性疾病，但再生障碍危象患者会因此更危急，出现呼吸困难、疲倦、甚至因日渐恶化的贫血出现意识模糊。也可进一步进展为充血性心衰及严重骨髓坏死[27-28]，导致患者死亡[29]。TAC 要立刻通过输血治疗。

3. 孕期感染和先天性感染　B19V 是胎儿水肿及流产的已知病因。有研究估计，在孕期前 20 周内经确认的 B19V 感染会导致流产率升高

9%[30-32]。目前，许多B19V导致的胎儿水肿可通过子宫内输血来治疗。

母体B19V暴露导致胎儿先天性贫血的病例罕有报道[33]。在这些病例中，病毒载量一般是低的，免疫球蛋白治疗贫血效果差。B19V感染引起的贫血症状与先天再生障碍性贫血（戴-布贫血）类似[34]，B19V宫内感染在诱导结构性骨髓功能失调中发挥的作用（如戴-布贫血那样）仍然不清楚。

4. 免疫抑制和免疫功能受损患者 对于免疫功能不全者，B19V感染可能引起中和抗体反应诱发失败，使祖红细胞发生慢性感染，最终导致红细胞产生障碍及慢性贫血（图109-2C）。有文献报道，持续B19V感染导致的单纯红细胞生成障碍能在很多不同种类的免疫功能不全患者中出现，从先天性免疫缺陷性疾病、AIDS、淋巴组织增殖性疾病到器官移植[35]。在这些患者中，B19V感染最典型的临床表现是持续性的贫血，而不是红疹及关节病等免疫介导的症状。单纯性红细胞生成障碍常见，其他细胞系也可能受影响。可通过减少免疫抑制进行治疗，更多的时候是给予免疫球蛋白治疗[36-37]。

5. 其他临床表现 B19V感染也和许多其他临床表现有关，包括血管炎、肝炎、心肌炎（和心肌病）、肾小球性肾炎、川崎病，以及病毒相关的噬血细胞综合征[38]。

6. 治疗 目前对B19V感染的所有症状只能对症治疗，目前能用的所有抗病毒药物没有抗细小病毒的作用。因为B19V不编码DNA聚合酶及病毒蛋白酶，所以抗病毒的靶点有限。虽然西多福韦已证明在体内具有一定抗病毒活性[39]，但尚未在体外得到证实。

(四)标本的采集、转运和储存

由于B19V是小DNA基因组，没有脂质包膜，所以能耐受大部分的物理性失活环境，对热稳定。所以，除了尽可能避免反复冻融外，对大多数临床标本没有特殊的运输和储存要求。如可能，应该采集血清（或血浆）样本，进行病毒载量、B19V IgM及IgG水平检测。其他样本类型包括脑脊液（神经系统感染）、羊水（妊娠期的检查）、骨髓（血液系统疾病），这些只能作为血清样本的补充，若未同时检测血液样本，将难以对结果进行解释。进行胎儿死亡调查时，可以用胎儿组织，样本可以冰冻，也可固定，但是冰冻更适合用于DNA分析。普通样本一般在室温中运输，组织样本除外（特别是胎儿肝）；组织样本若不固定，应在采集后尽快冰冻，并保持冰冻状态至操作前（因为这些组织中存在大量蛋白酶和DNA酶的活性物）。

(五)直接检测

1. 显微镜检测 体内或体外试验中的被感染细胞都为特征性的巨原红细胞（giant pronormoblast），或“灯笼细胞”（lantern cell）[40]。它们是早期的红细胞样细胞，直径25～32 μm，胞质空泡形成，含不成熟染色质，大嗜伊红核内包涵体（图109-3）。电子显微镜显示包涵体由病毒聚集形成大的队列而成，可以经单克隆抗体染色证实。在患者病毒血症高峰期，巨原红细胞可在感染个体的骨髓中发现，偶尔也可出现于外周血中[41]。虽然它们被认为是B19V感染的特征性表现，但在其他病原（包括HIV）感染者的骨髓中也可检测到相似的细胞，所以无其他确定性证据时，不能单独用于诊断B19V感染。

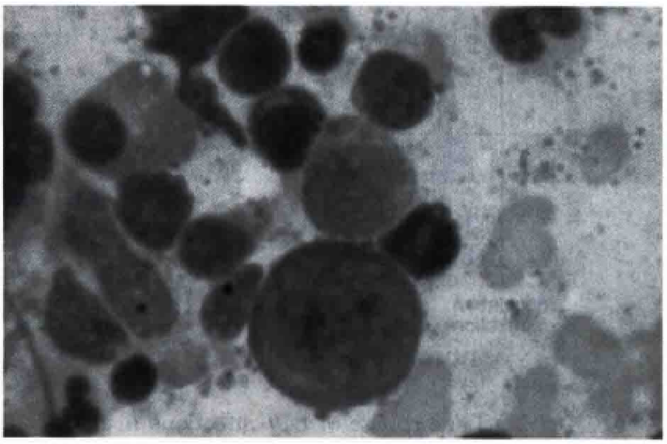


图109-3 “灯笼细胞”或巨原红细胞，典型的B19V感染，见彩插

当看到单个细胞中病毒聚集形成大的队列时，B19V很容易被识别。但是，感染细胞常未含有典型的包涵体，此时电子显微镜无法每次都区分出细胞内的病毒与核糖体，限制了电子显微镜的临床应用，只能作为研究工具。

电子显微镜可以检测到血清样本中的（浓缩后）高载量病毒（$>10^9$ U/ml），镜下可见特征性的直径22 nm二十面体病毒颗粒（图109-1）。由于免疫电镜技术使用多克隆血清使病毒聚集成簇，增加了检测的敏感性，使得病毒颗粒更容易

被鉴别。

2. 抗原检测　通常使用单克隆抗体进行抗原检测，与标准组织化学法（图109-4）一起用于鉴定组织中感染的细胞或细胞培养物。这种方法敏感性较低，可用于检测临床意义未明的B19V DNA低水平病例的感染细胞。抗原检测法在临床微生物学中发挥的作用有限。

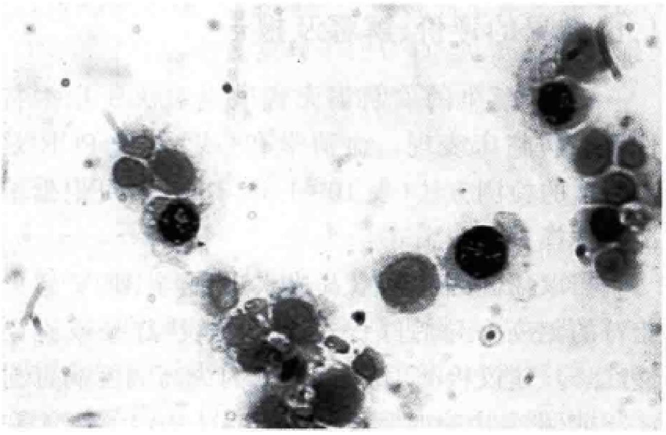


图109-4　B19V感染的人胎肝祖红细胞的免疫组织化学，使用抗衣壳蛋白抗体染色。注意衣壳蛋白在典型细胞核内的位置，见彩插

以B19V抗原为基础的检测方法相对不够敏感（$>10^6$病毒颗粒/ml），但抗原检测可以用于检测血清或血浆中的高浓度病毒，因此，被推荐作为检测血液或血浆中高滴度病毒的筛查方法[42]。

3. 核酸检测　B19V DNA检测是鉴定样本中B19V的首选方法。虽然原位杂交法可以用于鉴定特定细胞中的B19V DNA，直接杂交法检测血清中B19V DNA也已经在临床使用多年，但目前更常用的是应用PCR检测B19V DNA。由于PCR法具有极高的敏感性，患者完全康复后数月甚至数年时间内，都能在血清中检测到低水平B19V DNA。因此，临床上要求使用定量PCR时区分近期感染与既往感染。所有试验都要求根据WHO B19V核酸扩增试验标准进行校准[43]，结果以U/ml为单位报告。

已经有文献报道了大量不同的PCR引物及探针[44-47]，许多由不同公司开发的商业化试剂盒也有售，包括Abbott、Altona、Argene、Artus、Fast-track、Focus、Ingenetix及Roche等。关于不同方法之间的比较，没有相关报道，目前也没有获得FDA批准的诊断试剂。在选择检测试验时，引物应设计在病毒基因组较为保守的区域，例如，非结构蛋白序列区域，因这里有第二可读框[48-49]，并且所选引物应可以特异性检测出全部3个基因型。虽然基因组相对保守，但一个单核苷酸的差异就会显著影响检测的敏感性[50]。为了验证并确保选择的方法能同时检测出3个基因型，目前WHO发布了包括不同基因型的第一代国际参考盘[49]。

检测病毒RNA对于证实现存在病毒复制及活动性感染非常有用。常通过扩增跨剪接连接区域以进行检测，用于区分剪接后的RNA与病毒DNA[51]。这种方法通常仅作为研究工具。

（六）分离程序

B19V同所有自主性细小病毒一样，依赖于有丝分裂活性细胞进行自我复制。B19V的靶细胞范围也很窄，只能在人祖红细胞系中繁殖。骨髓中的祖红细胞对B19V的易感性随细胞分化程度的增加而增加。多能干细胞似乎不易感，B19V的主要感染细胞是CD36阳性红系克隆形成细胞及幼红细胞[52]。因此，B19V不能在标准组织培养中生长。

许多B19V的半允许细胞系（semipermissive cell lines）已经被报道，包括UT7/Epo[53-54]和KU812Ep6细胞系[55]。然而，有研究发现使用骨髓或胎肝细胞进行原代培养能获得更有效的病毒复制[40,56]。随着强化红细胞系分化方法的发展，在研究性实验室中已经能实现有效的B19V复制[57]。

（七）分型系统

B19V目前公认有3个不同基因型，不同基因型在DNA水平存在约10%变异性[48,58-59]。大部分检测出来的是1型B19V[58]，即原始B19V基因型，在世界范围内广泛分布。在加纳以3型B19V为主，>90%检出的基因型都为3型[60]。最初在较年长患者（1973年以前出生）的组织中检测到2型B19V，提示在20世纪70年代以前可能发生过较大流行[61]。但是，偶尔能在血液样本或献血者中检测出高滴度的2型B19V[62-63]，世界各地不断有文献报道在组织和血液中检测出2型和3型B19V序列[64-66]，提示病毒分布范围可能比之前估计得更广。虽然很少见，但也有感染低水平的一个以上基因型的病例报道[67]。

尽管不同基因型B19V在DNA序列上不同，但衣壳蛋白的序列保守，表现为不同型别间存在血清交叉反应及交叉中和作用[68]。目前尚无证据表明不同基因型在病毒学及疾病特征上有差异[69,70]。

(八)血清学试验

血清学调查最早是用敏感性相对较低的免疫对流电泳，而后被放射免疫法取代，现在普遍使用酶免疫法或化学发光免疫分析法。因为B19V不能在标准细胞培养体系中生长，早期血清学实验主要以合成肽[71]或者大肠埃希菌融合蛋白[72]作为抗原。但是，合成多肽或融合蛋白呈现的抗原决定簇并不能准确地重现天然病毒衣壳蛋白表位，实验的敏感性和特异性也不尽人意。使用杆状病毒[7,73]或酵母[74]表达体系获得的B19V衣壳蛋白如病毒样颗粒(VLPs)克服了这些问题，用此类抗原呈现出与天然病毒抗原良好的一致性。这些抗原相对容易大量生产且没有感染性。

使用VLPs作为抗原的免疫试验一般来讲具有较好的敏感性和特异性。可以使用IgM捕获法及间接法检测B19V IgM，捕获法敏感性更好，不易因类风湿因子的干扰出现假阳性。相反，在检测B19V IgG，尤其是在进行血清流行病学研究时，使用间接法(或夹心法)的形式更敏感。许多公司推出了针对B19V IgG和IgM的商品化免疫分析试剂盒，包括BioELISA、Diasorin(previously Biotrin)、DRG、EurImmune、IBL、Focus、Mikrogen、MyBiosource及Serion等。但是，其中几家公司的产品在设计时就定位只能用于科研。在美国，只有Diasorin assay经过美国FDA批准可用于临床诊断。

病毒特异性抗体通常于发病(再障危象)7天后产生，或发生感染性红疹1天后产生，可持续一生存在，有些研究提示会逐渐减弱[75]。对于免疫功能正常的个体，早期抗体反应针对主要衣壳蛋白VP2，随着免疫系统逐渐成熟，针对非主要衣壳蛋白VP1的抗体反应占优势[76-77]。持续B19V感染患者血清中特征性地含有VP2抗体，但没有VP1抗体[78]。许多其他检测策略也可见报道，包括表位特异性分析、免疫印迹分析、B19V感染亲和力分析[76,79]。除了免疫印迹法已经商品化外，其他方法只是在实验室内研发和应用，在研究性实验室外尚不可用。在特定专科，这些方法与B19V DNA病毒载量联合检测可能是有益的，特别是对于确定近期感染的时限(如妊娠期)[80]。

尽管有文献报道可检测中和抗体[46]，但十分费时且只适用于科学研究。

(九)结果的评价、解释及报告

B19V感染的诊断很大程度上取决于宿主特性及疾病临床表现。血清学和(或)定量PCR是最合适的检测方法(表109-1，图109-2)，可根据情况来选择方法。

当以往健康的儿童及成人出现与B19V感染相符的免疫介导的红疹时(即掌掴状红疹或感染性红疹)，建议检测B19V IgM，因为高滴度病毒血症与前驱症状的时程相关(图109-2A)。IgM在感染后数月内均可检测到。B19V IgG在红疹出现1天内就可以检测到，并持续终身。第5病患者在血液中能检测到B19V DNA，滴度 $>10^4$ U/ml，感染后2～3个月，B19V DNA滴度逐渐下降至 $<10^4$ U/ml。感染后，可能终身在组织或血液中都能检测出低水平B19V DNA。发生其他急性感染性皮疹时，可出现B19V IgM假阳性，如麻疹和风疹，此时可能误导临床医生。此外，B19V感染可能与类风湿因子[81]的生成相关，使其他血清学试验假阳性[82]。检测B19V病毒载量对于评估B19V IgM结果特异性有帮助。

异常红细胞生成增多或TAC的患者常能在血液中检测到 10^8～10^{14} U/ml病毒DNA(图109-2B)，临床诊断要结合定量PCR检测结果。因B19V IgM、IgG刚开始无法测到，若不联合B19V DNA，可能会漏诊。不推荐检测血清或血浆中的B19V抗原，因为免疫复合物形成可能会导致假阴性。

此外，也有极少量的出现瘀斑或紫癜的病例有同样高的病毒载量，但未能在血清中检测到IgM和IgG。对于这些患者，不能只依据IgM阴性就排除B19V感染。

持续感染微小病毒的免疫抑制或免疫功能受损的患者，经常会出现抗体反应低下或缺如，但全血或血清中B19V DNA载量高($>10^6$ U/ml，图109-2C)。此时应该依据定量PCR结果诊断。

当母亲被确认感染 B19V 时，常会怀疑胎儿是否感染。然而，胎儿感染紧随母体感染，会出现胎儿已经水肿了但是母亲 B19V IgM 抗体阴性的情况。此时，母亲 B19V IgG 亲和力（如果可以做的话）及 B19V DNA 滴度检测对于确认母体感染的时间可能有帮助[80,83]。

以往健康和免疫功能正常的个体在急性感染后可能在血清或组织中持续检测出低水平 B19V DNA。因此，单纯发现 B19V DNA 低滴度不能解释为近期感染或作为疾病的病原。

三、人博卡病毒

人博卡病毒（human bocavirus，HBoV）发现于 2005 年，当时为确定儿童下呼吸道感染的病因[84]而作为“病毒探索计划”中的一部分。这种呼吸道病毒现在被分类为 HBoV1。在粪便样本中检测到相关病毒：HBoV2、HBoV3、HBoV4 型[85-87]。

（一）病原体描述

HBoV1 具有典型的细小病毒科成员的结构，其基因组全长为 5543 个核苷酸，在 5′和 3′端有不同的发夹状序列。该基因组有 3 个大的可读框（ORFs）（同其他博卡病毒属成员），编码非结构蛋白（NS1）、衣壳蛋白（VP1 和 VP2）及第二个非结构蛋白（NP1）[88]。

VP2（主要衣壳蛋白）已经能在昆虫细胞中表达，并且能够自我装配成作为多数血清学试验基础的 VLPs（图 109-5）。其他博卡病毒（HBoV2[85]、HboV3[89]、HBoV4[87]）的编码序列已经清楚。不同种的 HBoV 序列之间有 10%～30%的差异，HBoV2 与 HBoV4 间基因变异和重组率增加[87]。

（二）流行病学和传播

HBoVs 呈世界性分布，在曾研究过它的国家中均有发现。HBoV1 主要在呼吸道分泌物中发现，其中 2%～20%的样本来源于上呼吸道或下呼吸道疾病的儿童[90]。虽然 HBoV1 的 DNA 在每个季节都可检测到，但与其他呼吸道感染类似，原发感染主要发生于冬春月份[84,91-92]。以 HBoV1 为抗原的血清学研究发现，绝大部分人在 6 岁以前被感染过[93]。

HBoV2、HBoV3、HBoV4 主要在肠胃炎患者

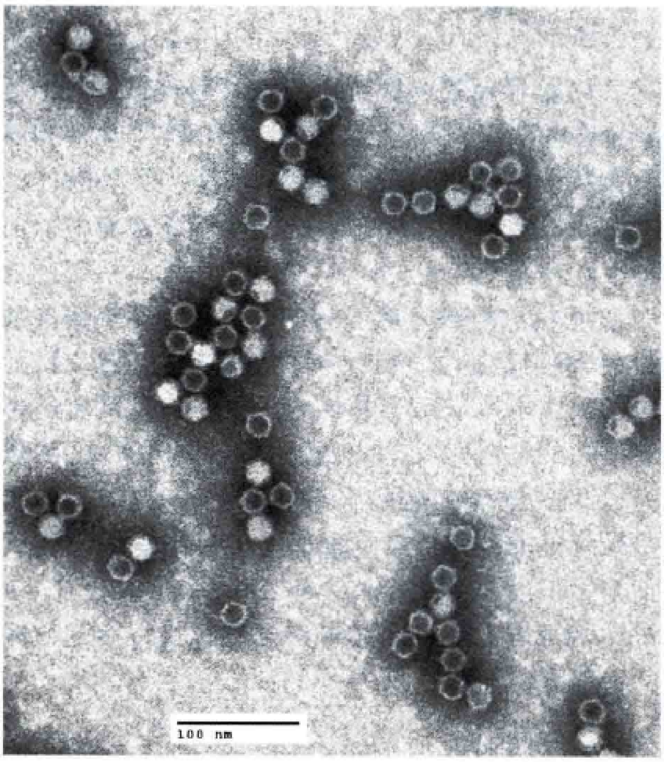


图 109-5 在昆虫细胞内表达的博卡病毒 VLPs

（成人及儿童）及健康对照的粪便样本中检测到[87,90]。HBoV2 是最常见的种，依次是 HBoV3，其次 HBoV4[90,93]。这也同样表现于血清流行病学中，血清阳性率从高到低依次为：HBoV1＞HBoV2＞HBoV3＞HBoV4。

HBoV1 主要经呼吸道传播，但在尿及粪便样本中均能检测出 HBoV1 的 DNA[94-95]，这提示其也可通过粪-口途径传播。HBoV2～HBoV4 主要在粪便中发现，通过粪便途径传播。

（三）临床症状

虽然在具有呼吸道症状的住院儿童呼吸道分泌物中常检测到 HBoV1 DNA，但很多病例中 HBoV1 常与其他病原同时检出，它是否是引起呼吸道症状的主要原因仍未明确[90]。现在清楚的是，在呼吸道或粪便样本中 HBoV1 DNA 可持续存在，如果使用更加严格的 HBoV1 感染诊断标准[呼吸道分泌物高病毒载量，血液中存在 HBoV1 DNA 和（或）血清学反应阳性]，数个研究团队的结果显示 HBoV1 感染与呼吸道感染（特别是哮喘）相关[96-98]。

由粪便博卡病毒引起的感染诊断标准尚未定义。在急性胃肠炎患者中能检测到 HBoV2～HBoV4，但在对照研究中，其阳性率与健康对照相似[99-100]。

(四)直接检查

1. 显微镜检查和抗原检测 虽然通过电子显微镜在粪便中可发现细小病毒样颗粒，但只有通过核酸测序才能真正确认 HBoVs。显微镜技术和抗原检测在博卡病毒感染的诊断和管理中价值不大。

2. 核酸检测 博卡病毒的诊断主要依据核酸检测，特别是定量 PCR。大量不同的引物和探针虽已被用于博卡病毒核酸检测[90-111]，但目前还未有不同检测体系之间敏感性和特异性的比较研究。NS1 和 NP1 区是病毒最保守的区域，因此也是最常见的检测靶点。市面上也有不少商品化试剂盒，如 Argene、Fast-track Diagnostics 及 Gentaur，常常是作为与其他呼吸道靶标进行多重检测的一部分。

(五)分离程序

HBoV1 能在人呼吸道上皮细胞中生长[112]，呼吸道细胞也被推测为病毒感染的主要复制点。HBoV1 虽在离体环境分化良好的上皮细胞中生长[113]，但病毒复制相对低效，只能作为研究工具。临床样本中病毒的检测一般使用 PCR 检测病毒 DNA。

(六)分型系统

至少存在 4 种不同博卡病毒，通过特异引物很容易基于 DNA 序列把它们鉴别出来。这些病毒在血清学上还是不同的，虽然抗原性不同常用于定义血清学反应特征，而不是用于鉴定病毒[114]。

(七)血清学试验

同 B19V 一样，几个研究小组已经可以在昆虫细胞表达人博卡病毒主要衣壳蛋白(图 109-5)，并使用血清学试验 IgM 和 IgG[115]。另外，博卡病毒 IgG 亲和力试验也有报道[116]。然而，大多数血清学实验检测的都是 4 种病毒的交叉反应性抗体，很少有研究去尝试区分这些抗体的反应性[114]。目前尚无这些试验的商品化试剂盒，虽然 SinoeGeneclon 声称具有博卡病毒 IgM 检测试剂。

(八)结果的评价、解释和报告

现在公认 HBoV 感染的诊断不能仅仅依据在呼吸道或粪便样本中检测到博卡病毒 DNA，因为 DNA 可能持续存在。对于 HBoV1，需结合血清中检测到病毒 DNA，以及提示新近感染的相关血清学证据，通常需要依据 IgG 血清阳转或检测到 IgM，或检测到低亲和力抗体。若没有用于血清学和 PCR 检测的血清样本，则在呼吸道分泌物中检测到高滴度(>10^4 拷贝/ml)HBoV1 DNA 可用于感染的诊断[90]。

尚未建立类似的 HBoV2～HBoV4 病毒感染标准。

四、人细小病毒 4

人细小病毒 4(human parvovirus 4，PARV4)也是在 2005 年“病毒探索计划”中为寻找血浆中的新病毒，使用序列非依赖性单引物扩增技术发现的。最初样本来自一个急性病毒感染的每天静脉注射药物成瘾的患者[117]。

迄今为止，5268 个核苷酸序列被确认。全基因组虽已解码，但末端反向重复序列尚未完成[117]。病毒基因组含有 2 个大的可读框及与其他的细小病毒极为不同的转录谱。现被归类到一个新的属四细小病毒属(Tetraparvovirus)。

PARV4 序列可分为 3 个主要群(groups)或基因型，基因型 1 和 2 主要在北美和欧洲发现，基因型 3 主要分布在非洲。不同型别的传播方式可能不同(尚未证实)，不同基因型别之间在病毒学及致病性上有无差异目前还不清楚。

研究者对欧洲、北美洲来源的血浆制品的混合样本进行检测，显示 PARV4 DNA 很容易被检测到(阳性率为 4%～5%)，病毒载量范围为<100 拷贝/ml 到 4×10^6 拷贝/ml[118]。全球其他地区的流行率可能会显著高于这个结果。

PARV4 在培养中不长，但一些研究小组已经能够在昆虫细胞内表达其衣壳蛋白。血清学研究显示，难得在普通人群中见到该病毒感染[119]，但在共用针头注射人群、接受血液制品者[120]及非洲部分地区[121]，均呈高血清阳性率。在欧洲、北美洲其主要传播途径可能为肠道外传播，但也不排除粪-口传播。

有关 PARV4 急性感染临床特征的相关信息特别少，只有极少的肠外暴露高风险获得感染的队列研究[122-123]。

通常通过 PCR 检测 PARV4 DNA 进行诊断。急性感染患者可能有短暂的高水平的血清 PARV4 DNA。但是，在 IgM 和 IgG 产生之前，高病毒载量的持续时间未知。目前尚无 PARV4 的商品化检测试剂盒，PARV4 检测仅是一个科研工具。

五、人布法病毒和托萨病毒

人布法病毒（human bufavirus，BuV）也是在一个宏基因组分析中发现的，来源于 2012 年布基纳法索腹泻儿童粪便[124]。这一次发现了一系列不同的病毒，包括原细小病毒属的一个新成员，人布法病毒。与其他新型细小病毒一样，研究者获得了病毒的完整编码区，但末端发夹序列不完整。目前发现 3 种不同的 BuV 基因型[125]，这些病毒都是从患有胃肠炎的儿童或成人的粪便样本中获得的，病毒载量较低，而且这些病毒通常与其他病原体有关[126-129]。抗体检测正在研究中，研究表明，在芬兰 5%的成年人曾有过感染[130]。关于其他国家的血清流行病学，尚未有研究报道。

另一种原细小病毒，托萨病毒（Tusivirus），来源于突尼斯一名腹泻儿童的粪便样本，发现于 2014 年，但这种病毒是否是真正的人类病原体仍未可知[131]。

参考文献请扫二维码查阅

第110章 痘病毒

VICTORIA A. OLSON, P. S. SATHESHKUMAR, INGER K. DAMON

（侯铁英、张妮 译；陶传敏、宁永忠 审校）

一、分类

本章讨论的所有痘病毒(poxvirus)均属于痘病毒科(Poxviridae)脊椎动物痘病毒亚科(Chordopoxvirinae)(第80章)。其属、种分类详见表110-1。基于DNA的试验分析(包括DNA测序技术)是目前识别与区分痘病毒属、种、株和变异体的最准确方法。正痘病毒(orthopoxvirus, OPXVs)、亚塔痘病毒(yatapoxviruses)、传染性软疣病毒(molluscum contagiosum virus, MCV)和副痘病毒(parapoxviruses)的G+C含量分别为33%、32%、60%和63%。

表110-1 感染人类的痘病毒分类

属	种
正痘病毒属	天花病毒、痘苗病毒、牛痘病毒、猴痘病毒
副痘病毒属	口疮病毒、伪牛痘病毒[a]、牛丘疹性口炎病毒、海豹痘病毒
亚塔痘病毒属	树鼠痘病毒、痘样病毒、牙巴样病病毒
软疣痘病毒属	传染性软疣病毒

注：[a] 导致人类挤奶者结节

二、病毒概述

病毒粒子体积较大，呈砖形(正痘病毒、亚塔痘病毒或软疣痘病毒)或卵圆形(副痘病毒)，长为220～450 nm，宽度和厚度为140～260 nm。电镜下病毒粒子的形态在一定程度上受样本制备的影响。利用冷冻电子显微镜观察未染色、未固定的切片标本，牛痘病毒(vaccinia virus, VACV)呈现光滑的圆角矩形，内含一均一的核心，其外面是一层30 nm厚的核心膜。利用传统负染超薄切片电镜观察，病毒核心呈哑铃形，由多层膜包裹。侧体(lateral bodies)占据外膜与核心之间的空间，可能在免疫调节发挥作用[1]。

病毒粒子包含病毒基因组编码的200种蛋白的1/2左右。其由结构蛋白和酶组成，包含一套几乎完整的RNA聚合酶系统，用于病毒基因的初始转录[2]。病毒基因组是130～375 kbp(具体长度取决于属)的双链DNA分子，包裹于核蛋白复合体的核心。基因组的两端DNA解旋，彼此共价连接，形成发卡环使基因组通过头尾相接的方式连在一起。已有数种不同痘病毒的全基因组序列被报道。GenBank包含了来自所有可用的公共来源的DNA序列(https://virology.uvic.ca/)。

在病毒复制过程中[2]，病毒粒子的形态首先形成于细胞质内一个被称为"病毒工厂"的区域内，该区域几乎没有细胞器。超薄切片电子显微镜观察显示，感染病毒的宿主细胞早期呈现新月型薄膜结构，然后逐渐形成卵圆形结构，称为未成熟病毒粒子，其包含一致密的核蛋白复合物。初级转录早于新月形物质(三维空间呈杯形)和未成熟病毒粒子的形成。砖形、膜包裹的成熟病毒粒子[(mature virions, MVs)，也称细胞内成熟病毒粒子(intracellular MVs)]，组成病毒核心致密物。这些特点可辅助电子显微镜专家对临床标本中的痘病毒进行识别和鉴定[3]。

一小部分MVs可能进一步通过微管从"病毒工厂"转运，经加工获得高尔基体或内质网含有特定病毒蛋白质的双层外膜(包膜)。然后，这个细胞内获得膜的MV沿着微管移动到细胞表面，在这里外膜与细胞膜融合形成脂质膜包裹的病毒粒子(enveloped virus, EV)。EV可以利用细胞肌动

蛋白丝，将产生的EV顶住，送到其他细胞表面进行下一轮感染，有助于病毒在细胞间进行传播。

迄今为止，痘病毒受体蛋白尚未明确。VACV的EV和MV黏附细胞的形式不同。MV通过形成膜融合复合物的方式进入宿主细胞。病毒进入细胞的常见结果是病毒脱壳，释放病毒成分到细胞中，启动由病毒控制的早期蛋白的转录过程。已有综述报道了病毒粒子进入细胞、形态形成、出细胞的全过程[4-7]。

三、流行病学与传播

目前，自然界中感染人类的痘病毒是散发性的人畜共患病原体，软疣痘病毒属(*Molluscipoxvirus*,MCV)除外，该病毒严格在人与人之间传播。人畜共患痘病毒包括正痘病毒属(the genera *Orthopoxvirus*)[包括猴痘病毒(monkeypox virus,MPXV)、牛痘病毒(cowpox virus,CPXV)和痘苗病毒(vaccinia virus)亚种的水牛痘病(buffalopox virus,BPXV)]，副痘病毒属(*Parapoxvirus*)[包括口疮病毒(orf)、伪牛痘病毒(pseudocowpox)、海豹痘病毒(sealpox)、丘疹口炎病毒(papulosa stomatitis)]，亚塔痘病毒属[树鼠痘病毒(tanapox virus,TPV)]，牙巴猴肿瘤病毒(Yaba monkey tumor virus,YMTV)和牙巴样病病毒(Yaba-like disease virus,YLDV)。口疮病毒和MCV感染是世界范围内最为常见的痘病毒感染。这些病毒引起的皮肤病变往往很容易诊断，因而临床诊断通常不需要进行实验室检查确认[8-10]。

(一)正痘病毒

1. 天花病毒 天花病毒，是引起天花的病原体，严格以人作为自然宿主，尚未发现动物宿主。最常见的人与人之间传播的方式是易感人群与感染者面对面的亲密接触时，通过空气中包含有病毒颗粒的飞沫进行传播。较少通过气溶胶、直接接触病变部位皮疹或脱落的皮痂等方式传播[11]。在全球性的疫苗接种计划实施后，天花在自然界已绝迹。已知的天花病毒毒株储存在于2个世界卫生组织(World Health Orga-nization ,WHO)的合作中心。

2. 猴痘病毒 1970年刚果民主主义共和国(Demo-cratic Republic of Congo,DRC)首次报道人类猴痘病毒病。自那以后，人类猴痘病毒病在利比亚、科特迪瓦、塞拉利昂、尼日利亚、贝宁、喀麦隆、加蓬等地区都有出现，但大多数病例出现在DRC。20世纪80年代，WHO在DRC进行的血清学调查和病毒学研究显示：①与人类一样，猴子的感染也呈散发性；②3/4的病例(主要为15岁以下儿童)源于动物接触；③疫苗免疫接种的保护率约为85%；④猴痘病毒宿主范围广，包括松鼠[非洲松鼠属(*Funisciurus spp*)和太阳松鼠属(*Heliosciurus spp*)]；⑤人猴痘病毒对家庭中未进行疫苗接种者的二次感染率仅为8%(即其传播能力远低于天花)。1996年2月至1997年10月间，DRC暴发了一次猴痘病毒疫情，在78个村庄共50万人中发现约250个血清学阳性病例。不同于以往的调查，这次约3/4的病例是通过继发性人传人感染，但在家庭中的传播率与1981—1986年的监测结果相同[12-15]。最近，DRC仍不断有病例被报道[16-17]，并且在2003年报道该病可形成持续的人传人传播链[18]。

2003年，猴痘病毒病在美国发生了一次暴发流行，再次证明了这种人畜共患病适应新生态环境的能力。感染猴痘病毒的西非啮齿类动物将其传播给北美土拨鼠，随后引起猴痘病毒在美国人群中的传播[19]。美国人群感染的猴痘病毒是西非猴痘病毒的变异株，与20世纪80年代发生在刚果盆地的典型猴痘病毒病的比较发现，其从临床表现到流行病学描述都具备典型的猴痘病毒病特征[20,21]。

3. 痘苗病毒 痘苗病毒的某些特定毒株被用于制作人类疫苗在全球范围内清除天花病毒[11,22]。自20世纪80年代早期以来，痘苗病毒及其他一些痘病毒开始作为表达多种蛋白的重组载体，包括疫苗免疫原。意外暴露可能导致实验室工作人员感染痘苗病毒，并已在未接种疫苗的感染者身上观察到了显著的病理改变[23]。因此，推荐在工作中可能接触活的、可复制的正痘病毒如痘苗病毒的人员接种疫苗。

痘苗病毒的起源和自然宿主尚不清楚[24]。通常认为痘苗病毒感染并非自然发生，尽管在消灭天花运动期间农场发生了疫苗到牛和牛到人的传播。据报道，痘苗病毒亚种(水牛痘病毒)在奶牛、耕牛和人之间传播的散发病例主要发生在印度，其他如埃及、孟加拉国、巴基斯坦、印度尼西亚等

国也有报道。可在动物奶头和挤奶员手部出现牛痘样结节。对印度1985年暴发的病毒分离株生物学数据和有限的DNA分析的研究提示，水牛痘病毒可能来自天花免疫接种时期从人传播至家畜的一些痘苗病毒株[25]。

非常有趣的是，多个不同的痘苗病毒发生在里约热内卢农村[26-27]和米纳斯吉拉斯州内的很多地区[26,28-30]的牛和农场工人身上，这些痘苗病毒可能与在巴西消灭天花运动中使用的疫苗株有关。利用新的技术方法重新评估以前的数据发现，牛痘样毒株早在20世纪六七十年代被分离。不慎暴露于用痘苗病毒做载体的重组狂犬病毒疫苗（用来控制野生动物的狂犬病）导致人类感染痘苗病毒的至少有2例，这2例均为通过家犬传播[32-33]。

4. 牛痘病毒 牛痘是一种非常罕见的人类职业性感染，可通过接触感染的牛而患病。其他动物（如感染的大鼠、宠物猫、动物园或马戏团的大象）在现代环境中也常成为该疾病的来源。牛痘病毒非常多样化，已从欧洲和亚洲毗邻地区的人和许多动物体内分离到[34-35]。在欧洲，牛痘病毒引起人类感染的一次暴发流行显示其与接触宠物鼠有关[36]。英国最近一项野生动物的血清学研究发现，一部分岸田鼠和森林小鼠体内存有正痘病毒抗体，这与小型啮齿类动物是牛痘病毒的中间宿主的发现一致[37]。

(二)亚塔痘病毒

人们对亚塔痘病毒的流行病学及自然史知之甚少。YMTV和YLDV感染常发生于动物饲养者[38]，而TPV是亚塔痘病毒属中主要的、自然发生的人类病原体[39]。*Tanapox* 病毒是一种发生在赤道非洲地区的地方性人畜共患病，其传播途径是通过昆虫叮咬感染人类，且多发生在雨季[50]。研究显示，前往某些亚塔痘病毒流行区域的旅行者可被感染[41-42]。

(三)副痘病毒

很多不同的副痘病毒疾病可在人类中发生[39,43]，一般为职业性感染，包括：挤奶者结节病（在奶牛中，这种疾病被称为伪牛痘或副痘苗）；口疮病毒（在绵羊和山羊中，被称为羊痘疮、羊传染性脓疱、传染性脓疱性皮炎、传染性脓疱性口炎或羊口疮）；丘疹性口炎（在小牛和肉牛中，被称为牛丘疹性口炎）。人类副痘病毒感染通过手或手指上的破损皮肤直接接触感染的牲畜，有时也可通过眼部接触感染[39,43]。海豹痘病毒感染已通过鳍足类动物传播给人类[44]。

(四)软疣痘病毒属

MCV是软疣痘病毒属中唯一的成员，且似乎只感染人类，在细胞培养基上很难生长。传染性软疣可在全球范围内发生，儿童通过直接皮肤接触传播，成人以性接触传播为主[39]。

四、临床意义

(一)正痘病毒

1979年12月，世界卫生组织的一个全球委员会宣布天花已被消灭，这一声明在1980年5月获得世界卫生大会的批准[11]。人类猴痘病是由猴痘病毒引起的新的天花样人畜共患病，反复发生在非洲刚果盆地地区国家（很可能为地方性），目前认为是最为严重的、自然发生的人类痘病毒感染[12,16,20,45]。2003年，美国发生的猴痘病毒感染是病原体适应新生态环境和宿主的典型案例。

1. 天花病毒 天花重症病毒毒株可引起"重症天花"（"variola major"），是一组包括严重的前驱症状、发热、极度虚弱和皮疹等临床表现在内的综合征。出现毒血症及其他类型的全身性休克时，病死率高达30%。对未接种疫苗的家庭成员接触者的二代感染发病率为30%～80%。天花轻症病毒株（alastrim、amass和kaffir病毒）引起"轻型天花"（"variola minor"），是一种相对较轻的感染，病死率在1%以下，但对家庭中未接种疫苗接触者的二代感染发病率与重症天花一样高。DNA及生物学研究资料显示，在欧洲和南美洲分离的alastrim天花轻症病毒株很相似，而与非洲天花轻症病毒株完全不同，非洲天花轻症病毒株更像是天花重症病毒株的变异株[8]。从流行病学角度看，按病死率区分疾病病征，目前的测序数据表明，造成较重感染或较轻临床症状的不同毒株之间的遗传差异是多种多样的。最后自然发生的天花病例是1977年10月出现在索马里，但1978年8月，在英国伯明翰大学还发生了1例致命的的实验室正型天花感染[11]。

自然获得的天花病毒感染可引起全身发热性皮疹。对于普通天花，经历10～14天(范围7～17天)的无症状潜伏期后，最常见的临床表现为发热，体温迅速上升至103℉(译者注：相当于39.5℃)，有时可见皮肤瘀点。相关的体征包括背痛、头痛、呕吐和极度虚弱。潜伏期后1～2天，出现全身皮疹，典型的为呈离心性分布(病变多出现在口咽黏膜、面部、手足，躯干处病变较少)。皮疹初为斑疹后为丘疹，继而扩大，4～5天进展为水疱，7天左右进展为脓疱，病变部位约14天可变硬并结痂，之后结痂脱落。皮肤病变较深且全身各处皮肤损伤均处在同一发展阶段。比上述典型皮肤损伤较轻或更重的皮肤损伤也有记载。不太严重的临床表现(改良天花或无疹天花)多发生在一些接受过疫苗接种的个体，而出血性或扁平型天花多发生在免疫功能受损的患者身上。

重症型天花可分为4种临床类型：①普通天花(可达90%的病例)，出现病毒血症、发热、虚弱和皮疹；②改良天花(5%的病例)，在先前接种过疫苗者出现轻度的前驱症状，皮肤损伤较少；③扁平性天花(5%的病例)，出现缓慢进展的局部病灶并伴有全身感染，病死率可达50%；④出血性天花(小于1%的病例)，出现皮肤黏膜出血，基本在发病1周内死亡。普通型天花的离散型是由alastrim轻症天花病毒的感染[11]。

在根除之前，天花本身比较容易判别，但其他出疹性疾病常被误诊为天花[10]，如水痘-带状疱疹病毒引起的严重水痘就常被误诊为天花[11]。但事实上水痘时，皮疹多为向心性分布且很少出现在手掌和脚底。此外，水痘即使有前驱发热和全身症状，也都较轻微。水痘引起的皮肤损伤一般较浅，且同一部位可见不同发展阶段的皮疹。其他易与水疱皮肤损伤阶段天花混淆的疾病包括猴痘、全身性的牛痘、播散性带状疱疹、播散性单纯疱疹病毒感染、药物反应(暴发型)、多形性红斑、肠道病毒感染、疥疮、蚊虫叮咬、脓疱疮和传染性软疣等。易与出血性天花混淆的疾病包括急性白血病、脑膜炎球菌血症和特发性血小板减少性紫癜。美国疾病控制和预防中心(CDC)与众多专业机构联合，研究出一种可评估患者是否患天花的方法，该方法和其他信息可在https://www.cdc.gov/smallpox/clinicians/diagnosis-evaluation.html网站查询。该方法的经验也已被总结归纳[46]。

2. 猴痘病毒 关于人类的猴痘病毒感染已有详细综述[12,45]。1958年在丹麦的首都哥本哈根，P. von Magnus首次在圈养的灵长类动物的皮疹上发现猴痘病毒病。此后在其他圈养动物包括动物园及进口动物中心的灵长类动物中也发现同样的疾病。

以刚果盆地变异株为代表的人类猴痘病毒的临床表现与天花非常相似，都出现发热、离心性分布(包括手掌和脚底)的水疱脓疱皮疹及呼吸系统疾病，部分病例出现全身性休克而死亡。与天花病毒一样，猴痘病毒可经皮肤损伤部位或上呼吸道黏膜侵入，引起黏膜疹和咳嗽。在原发性病毒血症期间，病毒转移到局部淋巴结；在继发性病毒血症期间，病毒扩散至全身出现皮疹。疾病前驱期，常见的是淋巴结病(通常在腹股沟部位)合并发热和头痛。个别皮肤病灶经历斑疹、丘疹、水疱和脓疱疹等发展过程。后遗症包括继发感染，病灶部位永久性瘢痕和凹陷，有时可见秃顶和角膜混浊。在2003年，由西非变种在美国引起的的急性疾病，临床症状表现较轻微，基因组序列分析、流行病学比较和临床资料支持2个不同分支的猴痘病毒的存在。关于该病临床表现的其他资料信息[47]均可以查到。

3. 痘苗病毒 人类在历史上最常见的痘苗病毒是天花疫苗(现称牛痘疫苗)，它是一种使人体产生交叉免疫从而预防其他正痘病毒感染的活病毒制剂。美国免疫计划咨询委员会(Advisory Committee on Immunization Practices, ACIP)关于牛痘疫苗接种的最新建议详见https://www.cdc.gov/mmwr/volumes/65/wr/mm6510a2.htm[48]。ACIP推荐对有正痘病毒暴露高风险的实验室和医疗工作人员进行疫苗接种。在美国，管理医师向美国CDC提出正式申请后，美国CDC药品管理处为其提供疫苗。牛痘免疫球蛋白可用于治疗可能发生的疫苗接种后的严重并发症。

疫苗接种一般采用多点穿刺的方法，在局部形成病变，在初次受种者中，该病变将在3周内以独特的方式发展和逐渐消退。在经皮接种疫苗的部位，2～5天可形成丘疹，8～10天疫苗接种部位经历水泡、脓疱阶段后皮肤损伤可达最大尺寸(直径约为1 cm)，并可于周围形成晕圈。疫苗接种14～21天后，脓疱干燥结痂脱落。在某些接种疫苗的儿童中，时有发生发热达100°F的现象，这在

成人中很罕见，另外，在儿童受种者中也观察到局部淋巴结肿大现象。

由于疫苗接种引起严重不良反应的风险增加，如出现痘苗湿疹与坏疽性牛痘，ACIP 指出，湿疹患者和免疫功能抑制患者禁止进行疫苗接种。疫苗接种的禁忌证在 ACIP 的报道中已描述清楚[48]。尽管尝试预筛疫苗接种的禁忌证患者以减少并发症风险，但疫苗接种后 10～14 天出现全身性牛痘皮疹的病例仍时有报道[49]。单从临床来看，通常很难分别全身性牛痘与多形性红斑，前者可能为血源性播散，而后者为免疫介导。播散性皮疹内病毒的实验室诊断可能有助于区分这些情况[49]。另外，目前正考虑将以安卡拉为基础的非复制改进型牛痘疫苗应用于这类禁忌人群中。

4. 牛痘病毒 人类牛痘病毒感染病变主要发生在手指，出现发红和肿胀。可能存在用身体其他部位进行自体接种的情况，免疫缺陷的接种者出现全身性严重感染也有报道。皮肤损伤与初次接种牛痘痘苗相似，局部出现丘疹，4～5 天后变成水疱，大致需要 3 周痊愈[34]。

（二）亚塔痘病毒

亚塔痘病毒属的 3 个成员（TPV、YLDV、YMTV）血清学上相关[38]。TPV 和 YLDV 的 DNA 图谱非常相似，提示为相同的病原体。这 2 种病毒的 DNA 图谱与 YMTV 的明显不同，尽管三者的 DNA 图谱存在广泛的交叉杂交现象[50]。

人类感染 TPV 和 YLDV 会出现短暂发热，随后出现坚硬、凸出的圆形坏死性黄斑结节，这与正痘病毒感染形成的水疱脓疱病灶明显不同。一般而言，只有很少病损继续发展，这些皮肤损伤主要见于前臂、面部、颈部或躯干皮肤[51]。发热、背痛及头痛为皮肤损伤前驱症状。在疾病恢复期内非脓疱性病灶出现凹陷，通常在 2～4 周内愈合。YMTV 引起上皮组织细胞瘤，这种瘤样组织细胞结节中伴有单核细胞浸润，可进展为化脓性炎症病灶。

（三）副痘病毒

人类副痘病毒感染通常与接触绵羊，山羊和（或）牛有关。挤奶者结节为红色扁平丘疹，后形成紫色、可触动、坚实的结节，直径可达 2 cm。病灶一般不痛，可持续 6 周。人口疮病毒感染通常发生在手指、手和手臂上，也可见于面部和颈部。可出现发热和引流区淋巴结肿大，病灶常形成溃疡且疼痛。病毒自体转移至眼部可能导致严重的后遗症[9]。与特定野生动物接触（如剥皮），包括鹿、驯鹿、羚羊、日本髭羚等，也是人类副痘病毒感染的途径。接触灰海豹的技术人员可感染海豹痘病毒[43-44]。

（四）软疣病毒属

在儿童和青少年中，传染性软疣病灶常分布于躯干、四肢（手掌和脚底除外）和面部，通常还可累及眼睛。感染通常经直接皮肤接触传播。MCV 经性接触在青少年及成人间传播时，病灶多见于下腹、耻骨、大腿内侧和生殖器部位。病灶结节呈珍珠状、肉色、突起、坚硬的、中央有凹陷，直径可达 5 mm。病变可通过自体转移而播散。在高效抗逆转录病毒疗法问世前，在美国，MCV 对于最多达 15％的艾滋病患者为条件致病病原体。通过限制性内切核酸酶图谱分析 MCV 至少存在 3 个亚型[10]。通过基因利用限制技术和碱基序列分析，在有限样本中检出 MCV 的 2 个主要亚型（MCV1 和 MCV2），但亚型与病征或地理分布的关系尚未明确[9-10]。已有研究显示，皮肤病变标本的快速 PCR 和限制性片段长度多态性分析可用于 MCV 分型[52]。

（五）抗病毒治疗

目前，还未有批准用于治疗痘病毒感染的药物，这也是目前正积极研究发展的领域[53]。实验性药物 ST-246 是痘病毒出细胞抑制剂，在非人类灵长类动物身上似乎表现出很好的抗正痘病毒的效果，包括天花病毒和猴痘病毒感染[54]，目前已被用于研究治疗人类天花（痘苗）疫苗不良事件[55]。DNA 聚合酶抑制剂西多福韦及其口服生物制剂的衍生物 CMX-001 体内外的研究数据均表明它们具有抗正痘病毒活性，目前也已被研究用于治疗人类天花（痘苗）疫苗不良事件[56]。疫苗免疫球蛋白已被批准用于治疗疫苗接种后的严重不良反应，可从 CDC 获得。

五、样本的收集、运输及保存

发现疑似天花病例后，应立即向地方或州卫

生部门报告。地方卫生部门审查完成后若仍怀疑天花，则立即上报CDC。目前进行天花病毒实验操作，国际上建议在WHO认可的生物安全4级(BSL4)实验室内进行。目前，2个世卫组织合作(WHOCCs)拥有处理天花样本的能力：一个是位于亚特兰大的美国CDC，另一个是位于俄罗斯科尔索沃州的国家病毒与生物技术中心。位于CDC的WHOCC还拥有相应的防护设施以应对猴痘病毒和其他输入性痘病毒(如TPV)。通常，怀疑含有其他痘病毒(如副痘病毒和MCV)的临床标本可以让当地有经验的工作人员使用生物安全2级防护设施和设备来进行检测。此外，除了使用3级生物安全防护设施、设备及利用他们的工作经验外，有潜在痘苗病毒职业暴露风险的实验室工作人员还可以考虑疫苗接种。

对于大多数可疑痘病毒感染者而言，取至少2～4个结痂和(或)水疱病变物用于实验室检测比较合适。结痂可以从底层完整皮肤用手术刀或26号针来分离，并且每个样品应存储在一个单独的容器中，以避免交叉污染。人们已经发现了水痘和猴痘这2种病毒同时存在的感染性出疹性疾病[15]。

病变部位取样时将囊泡液和上覆皮肤都需要收集起来。覆盖的皮肤被掀起放置在样本容器后，囊泡的基底部需要用木制的敷贴或聚酯棉签彻底擦拭。黏性组织用拭子取样，或者放置在一个干净的玻璃显微镜载片上风干。用一个干净的玻片从一端逐渐用力按压到病灶标本上，如有条件，可使用3个电子显微镜网格从光泽面到无顶囊泡观察病灶标本，对应使用最小的、中度和较大的压力压病灶。载玻片和电子显微镜网格应风干约10 min，然后放置在一个玻片架或网格运载盒上运输到实验室。

其他病变组织的采样方法也正在评估中，包括将要保存的组织放置在合适的过滤纸上。不主张将标本放在标本运输液中(如存储疱疹病毒的方法)，因为稀释的样本会降低电子显微镜直接检测的敏感性。对于电镜取样和样品处理的具体建议可以在网站(https://www.cdc.gov/smallpox/lab-personnel/specimen-collection/negative-stain.html)上查询。病变组织活检也可以提供适用于病毒直接检测或免疫组化的材料。可获得3～4 mm厚的活检穿刺样本，然后分为两等份，一份置于福尔马林中进行免疫组织化学检测，另一份放置在采集容器中。在天花时期，天花疑似病患在前驱发热期和皮疹早期采集的血标本和咽拭子也是痘病毒的潜在来源[11]。

患者血清也可用于血清学试验，它可用于证实病毒感染诊断或推断一个回顾性诊断。同时取急性期和恢复期血清标本对感染的诊断具有重要价值。取血清在病程越早期越好，然后，3～4周后再采集1次。

大多数含病毒的标本应冷冻储存在－20℃环境中或用干冰储存，直到样品到达其转运目的地。存储在标准冷藏温度的标本可以保存7天以下。电子显微镜网格和福尔马林固定的组织应在室温下保存。

六、痘病毒实验室诊断的临床应用

痘病毒感染通常可以通过皮疹的外观和相关的皮肤病理改变进行鉴别[58]。另外，多种不同的临床实验室试验也可用于识别和区分痘病毒，这些检测方法包括电子显微镜检查、抗原检测、核酸检测、病毒生长特性检测、血清学试验等。这些检测方法应用于痘病毒感染的诊断见表110-2。

表110-2 痘病毒诊断检测方法[a]

病毒	HP	EM	HA	NAAT	分离	血清学
正痘病毒	X	X	X	X	X[b]	X
副痘病毒	X	X		X	X[c]	X
亚塔痘病毒	X	X		X	X[c]	X
MCV	X	X		X		

注：[a]HP. 组织病理学；EM. 电子显微镜技术；HA. 血凝；NAAT. 核酸检测。X表示某方法检测某种特定病毒的可用性。[b]CAM上痘痕形成，组织培养也可有效分离。[c]仅组织培养可有效分离，病毒不会在CAM产生痘痕

七、直接检测

(一)显微镜观察

电子显微镜检查是实验室诊断痘病毒感染的一线方法。消灭天花时期，病变样本负染电镜观察曾被广泛使用。由于现在痘病毒感染的临床诊断不常见，电子显微镜观察可能提供不明原因出

诊性疾病的首个线索。虽然电子显微镜可以从形态上区分正痘和副痘，但它还不能区分到种的水平。正痘有一个独特的砖形，并且在用磷钨酸钠或其他重金属负染检测时会呈现多瘤形态（图110-1）。副痘病毒则为卵形，表面螺旋式纵横交错。负染色方法检测天花病毒的相对敏感性可达95%，用于检测痘苗病毒[59-60]可达75%。如上所述[61]，通过直接将预制网格按压进无覆盖皮肤的底部可提高敏感性。负染方法的评价和负染电镜照片可从网址（https://www.cdc.gov/smallpox/lab-personnel/specimen-collection/negative-stain.html）和其他地方得到[60,62]。

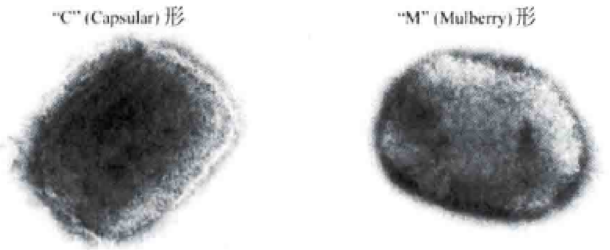


图 110-1 细胞培养的猴痘病毒负染后在电子显微镜下的2种砖形形态。M(mulberry)病毒颗粒的表面覆盖有短的、螺旋状丝状物，而C(capsular)形式的病毒颗粒子被染色穿透，呈现出边界清晰、致密的核心，并被不同密度的几层组织包围。图片由CDC的公共卫生图片室的C. Goldsmith、I. Damon及S. Zaki惠赠

当用瑞姬苏木素-伊红染色方法进行染色时，痘病毒会产生具有特征性的外观。痘病毒感染的细胞可观察到嗜碱性核周或B型胞质包涵体（病毒工厂或病毒质），它们是病毒复制的位点。某些正痘病毒属群（如牛痘病毒）还可以产生嗜酸性或A型包涵体。根据不同的毒株，A型包涵体可分为含病毒粒子（V^+）和不含病毒粒子（V^-）的类型。

（二）抗原检测

正痘病毒是唯一能产生血凝素（HA）抗原的痘病毒，其检测可通过鸡红细胞吸附或凝集试验进行（使用的鸡红血球必须经过预试验证明能产生血凝现象）。正痘病毒抗原能通过 Tetracore Orthopox BioThreat 试剂盒快速检测，它采用了侧流层析法快速检测临床标本中的病毒。该试剂盒已被证实能在皮肤损伤病变标本中检出痘苗病毒与猴痘病毒[63]。直接检测临床样本中的痘病毒抗原在许多实验室中并不作为常用的诊断方法。

（三）核酸检测

在CDC的WHOCC用PCR检测来分析样本中的痘病毒DNA。最近的进展试验证了一项泛(全)-痘病毒的PCR试验（a pan-poxvirus PCR assay），可以用来筛查样本中除禽痘病毒（avipoxviruses）之外的其他痘病毒[64]。多个单基因PCR检测，然后，采用限制性片段长度多态性分析或扩增产物的序列分析，可以鉴别正痘病毒的种别。许多不同的基因靶点开始被用于检测，包括HA基因检测，该基因仅存在于正痘病毒属中；B细胞因子应答修饰基因（*CrmB* 基因，由正痘病毒产生的几种不同的肿瘤坏死因子的同源受体之一）；以及A型包涵体蛋白基因。在这些分析方法中，任何正痘病毒DNA都可以扩增（表110-3），扩增产物经过合适的限制性内切酶消化，酶切后的片段通过电泳成像。片段大小与参考毒株的限制性片段长度多态性图谱进行比较，从而区分检测样品中毒株的种别。传统PCR方法检测其他痘病毒属也有报道[65]。其他核酸诊断方法（包括随机扩增多态性DNA片段长度多态性）也可用于正痘病毒种、株的鉴别[66-67]。微芯片通过PCR扩增后的荧光标记的DNA片段与固定在芯片上的正痘病毒种特异性（orthopoxvirus species-specific）序列进行杂交观察，从而鉴定痘病毒的种别。

实时PCR高敏感性且快速出结果的特点使之受到实验室临床诊断用途的青睐[68]。在美国，许多国家级的参考实验室及实验室反应网络（the Laboratory Response Network）中的实验室使用这一核酸检测方式来快速诊断正痘病毒感染疑似病例或排除天花感染。在这类试验中，使用一个到多个探针以确保方法的特异性；但过高的敏感性可能导致检测样本携带污染的假阳性。许多检测正痘病毒及其他痘痘病毒的方法总结见表110-4。这些检测主要在某些特定的参考中心进行，包括CDC痘病毒项目组/WHOCC的天花和其他痘病毒感染组。

表 110-3　检测正痘病毒的传统 PCR 方法

靶标	引物[扩增长度(bp)]	检测方法[a]	参考文献
HA	EACP1/EACP2(旧世界病毒)(900)	Taq I	[83]
	NACP1/NACP2(新世界病毒)(600)	Rsa	
CrmB	VL2N/VL33(痘苗,1200;猴痘,天花,牛痘,1300)	NlaⅢ[b]	[84]
A 型包涵体蛋白	ATI-low-1/ATI-up-1(1500～1700)	BglⅡ或 XbaⅠ	[85-86]

注:[a]扩增产物用特定的限制性内切酶消化以鉴别不同病毒。[b]鉴别猴痘、天花和牛痘病毒

表 110-4　实时荧光定量 PCR 方法检测痘病毒[a]

属;种[b]	基因靶点[c]	平台或方法	注释	不足	检测阈值	参考文献
正痘病毒;副豆病毒和软疣痘病毒	试验 1:E_ORF_C(正痘病毒)(FAM) 试验 2:口疮病毒包膜蛋白(副痘病毒)(VIC) 试验 3:MC001R(软疣痘病毒)(FAM 和 VIC)		以一种分子 DNA 作为空白对照,基于彩色色谱分析的多重试验,可用于检测引起感染的痘病毒基因组		<10 拷贝	[87]
正痘病毒	HA/A56R	LightCycler 有杂交探针	融点曲线分析法可区分天花病毒和其他正痘病毒	多种牛痘病毒和骆驼痘病毒株与天花病毒有一样的溶解温度	5～10 拷贝	[88]
正痘病毒;天花病毒;猴痘病毒;牛痘病毒和痘苗病毒	试验 1:A38R(VAR)(FAM) 试验 2:B7R(MPX)(TAMRA) 试验 3:D11L(CWX)(JOE) 试验 4:B10R(VAC)(Cy5)	TaqMan	基于彩色色谱分析的多重 PCR 实验,可检测哪种正痘病毒引起的感染		NA	[66]
正痘病毒;天花病毒;猴痘病毒;	试验 1:B12R(VARV)(FAM) 试验 2:F13L(MPXV)(JOE	TaqMan	使用不同标记的探针进行多重检测,可以同时检测和鉴别病毒		NA	[89]
正痘病毒;天花病毒	HA/A56R	TaqMan	天花病毒特异探针		25 拷贝	[90]
正痘病毒;天花病毒	HA/A56R	LightCycler 杂交探针	融点曲线分析法可区分天花病毒和其他正痘病毒	多种牛痘病毒株与天花病毒有一样的溶解温度	2.74～9.88 拷贝	[91]
正痘病毒;天花病毒	试验 1:Rpo18 试验 2:VETF 试验 3:A13L(VAR) 试验 4:A13L(nVAR-OPX)	LightCycler 杂交探针	融点曲线分析法可区分天花病毒和其他正痘病毒		NA	[92]
正痘病毒:天花病毒	试验 1:B10R 试验 2:B9R 试验 3:HA/A56R	TaqMan		试验 1 和 2:部分牛痘病毒株被扩增 试验 3:与参考文献 88(采用稍微缩短的探针)中的检测一致	12～25 拷贝	[93]

（续 表）

属；种[b]	基因靶点[c]	平台或方法	注释	不足	检测阈值	参考文献
正痘病毒；天花病毒	14 kD/A27L	LightCycler 杂交探针	融点曲线分析法可区分天花病毒和其他正痘病毒		>12 拷贝	[94]
正痘病毒；天花病毒	*crmB*	LightCycler 杂交探针	融点曲线分析法可区分天花病毒和其他正痘病毒	采用 PCR 限制性酶切分析进行天花病毒特异性鉴定	5 拷贝	[95]
正痘病毒；天花病毒	*crmB*	2 个 TaqMan 探针	一个是天花病毒特异探针		10～100 拷贝	[96]
正痘病毒；天花病毒	试验 1：A4L 试验 2：A36R 试验 3：A13L 试验 4：E9L	TaqMan	专为检测天花病毒设计的特异性探针	某些牛痘病毒被发现与 A13L 和 E9L 交叉反应	250 拷贝	[97]
正痘病毒；天花病毒	14 kD/A27L	TaqMan	2 个探针；1 个天花病毒特异探针		25 拷贝	[98]
正痘病毒；天花病毒	HA/A56R	TaqMan	2 个探针；1 个天花病毒特异探针		25 拷贝，50～100 拷贝	[99]
正痘病毒；天花病毒	HA/A56R	LightCycler 杂交探针	融点曲线分析法可区分天花病毒和其他正痘病毒		13～1300 拷贝	[100]
正痘病毒；猴痘病毒	试验 1：B5R(MPX) 试验 2：E9L（nVAR－OPX）		猴痘病毒特异检测（MGB 探针）；正痘病毒属一非天花病毒检测（TaqMan）	MGB 探针的最佳检测平台是 iCycler iQ 和 SmartCycler	试验 1：10 ng 试验 2：2 pg～20 fg	[101]
正痘病毒；猴痘病毒	试验 1：G2R(MPX) 试验 2：G2R(MPX－西非) 试验 3：C3L(MPX－刚果盆地)	TaqMan			3.5 拷贝	[102]
正痘病毒；猴痘病毒	E9L	TaqMan MGB 探针			NA	[103]
正痘病毒；痘苗病毒	B8R	TaqMan			$10～10^6$ 拷贝	[104]
正痘病毒；牛痘病毒	D11L	TaqMan			20 拷贝	[105]
正痘病毒；牛痘病毒	A55R	TaqMan		某些牛痘病毒中发现这个目的基因的缺失	NA	[106]
正痘病毒；牛痘病毒	D8L	TaqMan			20 拷贝	[107]
亚塔痘病毒	101nt PstIL 片段	TaqMan		检测 YLDV 和 TPX，不能检测 YMTV	8 拷贝	[108]
副痘病毒；羊口疮病毒 (Orf virus)	B2L	TaqMan			$10～10^6$ 拷贝	[109]
副痘病毒；羊口疮病毒	RNA 聚合酶	TaqMan	2 种不同的引物/探针组合；一种特异性针对副痘病毒属；一种特异性性针对羊口疮病毒种		NA	[110]

（续　表）

属；种[b]	基因靶点[c]	平台或方法	注释	不足	检测阈值	参考文献
副痘病毒；羊口疮病毒	DNA 聚合酶	TaqMan		未进行针对对其他副痘病毒特异性的检测	15 拷贝	[111]
副痘病毒；羊口疮病毒	ORFVO24（NF-κB 抑制剂）	TaqMan		未进行针对对其他副痘病毒特异性的检测	15 拷贝	[112]
副痘病毒；羊口疮病毒	DNA 聚合酶	TaqMan	使用 2 种标记不同的探针进行双重分析，一种用于 orf 病毒，一种用于 Capripoxvirus	未进行针对对其他副痘病毒特异性的检测	175 拷贝	[113]
副痘病毒；羊口疮病毒伪牛痘病毒和牛丘疹性口腔病毒	RNA 聚合酶基因	TaqMan	4 种不同的引物探针组，一种针对副痘病毒通用，其余分别特异性针对羊口疮病毒、伪牛痘病毒和牛丘疹性口腔病毒		10 拷贝	[114]
副痘病毒软体动物病毒；	B2L	TaqMan			4.7 拷贝	[57]
接触传染性软疣痘病毒	P43K MC080R	TaqMan	P43K 的焦磷酸测序法可区分 MCV1 和 MCV2		10 拷贝	[115]

注：[a]FAM. 6. 6-羟基荧光素；JOE. 6-羧基-4，5-二氯-2，7-二甲氧基荧光素；MGB. 小沟结合物；NA. 不确定；nVAR－OPX. 非天花正痘病毒；TAMRA. 6-羧基四甲基罗丹明；VETF. 病毒早期转录因子。[b] 黑体字表示属名。[c] 正痘病毒检测针对性的牛痘-哥本哈根命名法

八、分离和鉴定

正痘病毒可在多种已建立的细胞系上生长，包括 Vero、BS-C-1、CV-1、LLCMK-2 猴肾细胞、人胚胎肺成纤维细胞、HeLa 细胞、鸡胚胎成纤维细胞和 MRC-5 人类二倍体成纤维细胞，以及恒河猴胎肾细胞（FHRK-4）。除 WHOCC 外，均不能尝试繁殖天花这样的高风险样品。当长形细胞质延伸后细胞慢慢变圆，说明细胞病变效应（cytopathic effect，CPE）出现了（图 110-2 和图 110-3）。在有些情况中，也会出现合胞体的形成；图110-3B

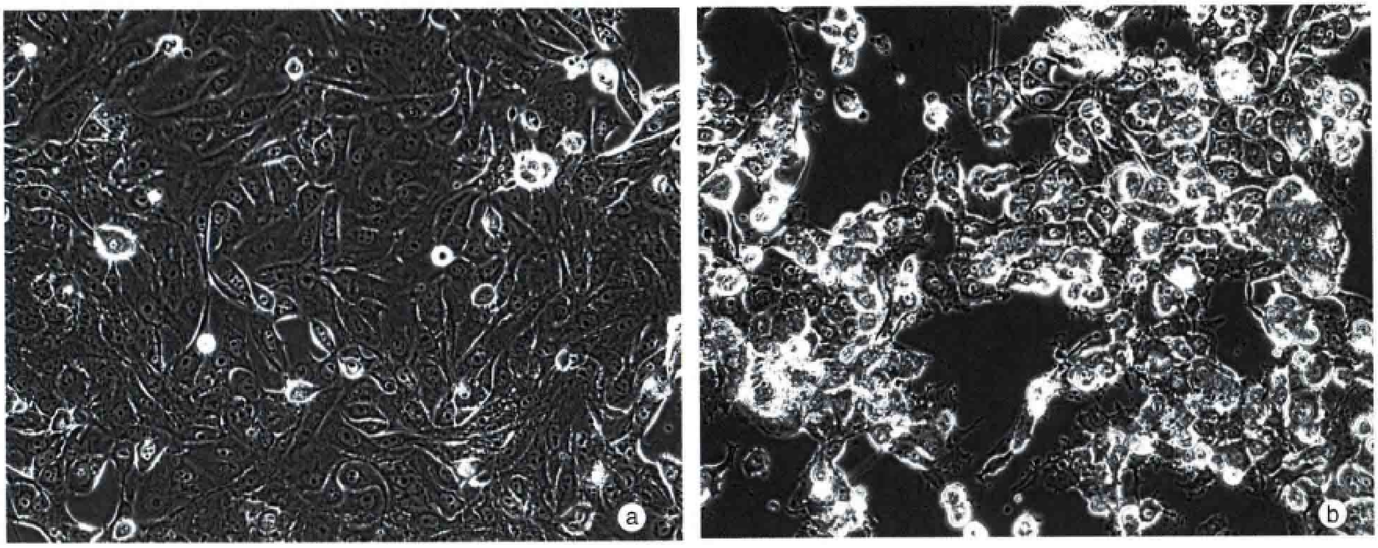


图 110-2　痘苗病毒（"牛痘苗"）在 FHRK-4 细胞中的 CPE。a. 早期 CPE；b. 成熟 CPE。由 V. Olson 馈赠，见彩插

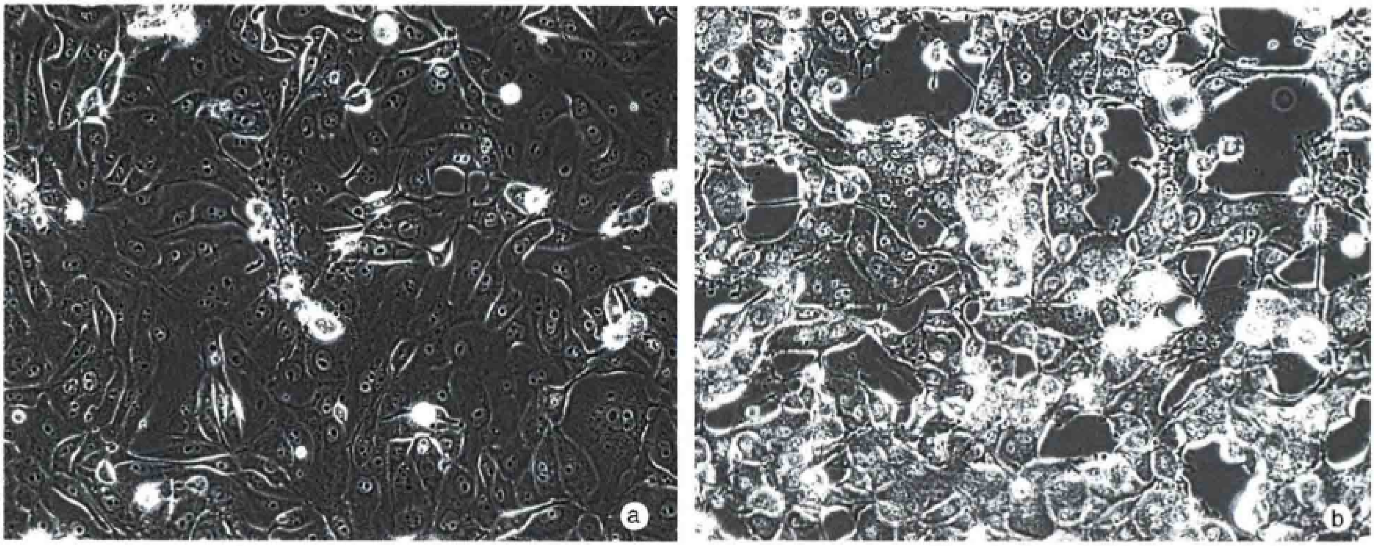


图 110-3 猴痘病毒（刚果盆地基因簇，v79-I-005）在 FRHK-4 细胞中的 CPE。a. 早期 CPE；b. 成熟 CPE 伴合胞体形成。由 V. Olson 馈赠，见彩插

显示猴痘病毒诱导的细胞病变效应。细胞病变效应发生的时间主要取决于感染性接种物。大部分实验室通过 PCR 法来确定（接种物中）一种特异性的正痘病毒属的存在（见上文）。在 12 天鸡胚的绒毛尿囊膜（chorioallantoic membrane，CAM）上进行正痘病毒培养和形态学识别的方法在既往已有描述[59-60,69-70]。正痘病毒是唯一一种可以在受精鸡蛋的 CAMs 上产生痘痕的人类痘病毒[69-70]。痘痕形态可用于区分生物种别和变异种。副痘病毒、亚塔痘病毒和 MCV 不会在 CAM 上生成痘痕，禽痘病毒、野兔痘病毒属（Leporipoxviruses）、山羊痘病毒属（*Capripoxviruses*）却可以。痘病毒属的分类和鉴定通常采用高价免疫参考血清的中和试验来进行[25,39,59-60,71]。但是，由于同一属内的痘病毒其抗原性联系紧密，这就导致鉴别感染病毒种别的工作变得很困难。

九、血清学试验

(一)正痘病毒

当得不到含有病毒的临床标本时，抗体检测可能成为发现疾病病因的唯一方法。目前，用于针对人正痘病毒抗体的血清学试验方法包括酶联免疫吸附法（ELISAs）、病毒中和试验、免疫印迹法和血凝抑制试验。CDC 用于痘病毒血清学试验的各种不同的操作流程在其他文献中有详细介绍[40]。

正痘病毒 IgM 检测法的出现对增强正痘病毒感染暴发调查（往往半回顾性性质[40]）提供了很好的前景。这种检测技术对调查正痘病毒引起的近期感染或疾病非常有用，也可用于流行病学监测研究中的发病率评估。例如，在美国 2003 年猴痘病毒暴发期间，经过对出疹后 4～56 天的患者（流行病学上有关联且经实验室确诊）收集的血清进行血清学检测，发现 IgM 捕获实验结果具有高达 95％的敏感性和 95％的特异性。有 1 例低度的应答（也称为“模棱两可的”）的结果有待进一步研究。有文献报道，正痘病毒 IgM 体检测法也用于 1 例伴发猴痘的脑炎患者的脑脊液[72]。采用多肽做抗原的酶联免疫吸附试验进行猴痘病毒特异抗体检测也有报道[73,74]，它可以区分猴痘病毒和痘苗病毒。然而，由于整个正痘病毒属内病毒的序列保守性，这种 ELISA 法可能会与天花病毒及许多牛痘病毒病毒株发生交叉反应。因此，考虑到其临床应用性还不成熟，所这种方法目前还只是作为调查工具，而不是一种临床检测工具。猴痘病毒的特异性抗体已被分离，了解其抗原表位特点对设计用于猴痘病毒特异性血清学检测的多肽提供了很好的视角[75-76]。

在现阶段的生物恐怖应对意识中，评价疫苗接种后的残留保护效果的检测很有必要。同时，应注意，现阶段还没有一个常规的免疫检测方法来定义个体抵抗痘病毒感染的保护程度。这种保护通常需要有细胞介导和体液介导免疫的协同应

答。研究[77]显示，体液免疫应答可能是从全身性正痘病毒感染恢复和存活的关键因素。中和抗体的出现预示着感染的恢复，但不总是提供对将来感染的长久的预防保护。天花、猴痘、牛痘、痘苗病毒的中和抗体在感染或者接种疫苗后 6 天就可以检测到，中和抗体已在接种疫苗或其自然感染其他人类正痘病毒后长达 20 年期间被检测到。

正痘病毒中和试验的传统做法是通过观察嗜斑数量的减少。这个试验已经被改进为通过绿色荧光蛋白标记的痘苗病毒测量病毒进入组织培养的细胞[78-79]。在病毒中和试验中，急性期和恢复期抗体滴度增加 4 倍通常可诊断为痘病毒感染。如果只能得到一个感染阶段的一份血清样本，确定临床病毒感染的诊断可能很困难，甚至是不可能的。因为正痘病毒之间密切相关，血清交叉吸收试验(例如，在免疫荧光抗体或免疫扩散试验中所做)已用于人类和动物的血清检测中，效果不尽相同。正痘病毒抗原交叉吸收试验采用高价免疫动物血清，已被用于人类或动物的猴痘病毒感染的血清学调查[59-60]。假阳性结果应该通过使用适当的已知对照血清进行排除。Towbin 等[80]进行了免疫印迹法的研究，主要通过利用各种不同的抗原进行[包括纯化的病毒，有时是感染细胞培养液的浓缩物(包含 1%或没有血清补充液)]。实验室很少采用这种方法，因为还没有可靠的标准化程序。

(二)伪牛痘病毒、口疮痘病毒、树鼠痘病毒和接触传染性软疣病毒

用于辅助确诊副痘病毒属感染(挤奶工结瘤和羊口疮痘)的血清学方法包括 ELISAs[81]和免疫印迹分析，这些方法采用了不同的抗原制备程序。利用病毒感染细胞培养的浓缩物中获得的抗原进行标准化 ELISA[81]、间接免疫荧光抗体试验及中和试验都是有效的、诊断 TPV 感染的血清学方法。血清收集的最佳时机是在实际发病时和疾病发作后的 3～5 周，或者更后的时间点收集。因为 MCV 在培养中不易生长，因此，没有常规的血清学检测方法可供使用。接触传染性软疣临床诊断较容易，常常在当地诊断机构的电子显微镜和组织病理检查的帮助下就可完成。

十、结果的评价、解释和报告

为了确认感染致病因子，细胞培养或别的可证明活病毒存活的方法被视为金标准。像天花这样的高危样本不能在 WHOCC 之外的其他机构尝试培养。由于缺少现成的或者可行的组织培养方法，因此，运用多种诊断试验或技术可提高诊断的特异性。核酸扩增试验虽然敏感，但可能导致假阳性的结果。一项由分布于 3 个地理区域(欧洲国家、澳大利亚和美国)的 33 个实验室进行的核酸扩增试验能力调查发现了大量的假阳性结果(最高可达 12%)，强调完好的分子生物学实践的必要性，当需要检测潜在生物恐怖病原体时更为重要[82]。具有不同检测靶标的多重核酸检测技术的使用能提高诊断的特异性。电子显微镜技术可用于从属类上评估痘病毒的存在，如有多种病毒形式存在，电子显微镜技术也能够用于推断感染病毒的成熟形态，但不能用于特异病毒属的鉴别(除了发生副痘病毒属感染的病例)。在世界各地少数的几个参考实验室可用血清学检测，但很少能将其用于特异的病毒种别的诊断。在世界各地少数的一些参考实验中心，结合免疫学分析的免疫组织化学法能够用于认可识别痘病毒属。核酸扩增、病毒培养、血清学试验、电子显微镜技术和(或者)免疫组织化学技术的结合，可提高诊断的敏感性和特异性。

本章的调查结果和结论是作者的结论，不一定代表疾病预防控制中心的观点。原稿中产品名称的使用并不意味着美国卫生与公众服务部的认可。

参考文献请扫二维码查阅

第13篇

亚病毒

第111章　乙型肝炎病毒和丁型肝炎病毒*

YI-WEI TANG，REBECCA T. HORVAT，MARIE-LOVISE LANDRY

（杨滨　译；崔仑标、杨志宁　审校）

一、乙型肝炎病毒

(一)分类

乙型肝炎病毒(hepatitis B virus，HBV)是一种DNA包膜病毒，属嗜肝DNA病毒科，正嗜肝病毒属，发现于1965年澳洲土著居民的血液样本[1]。HBV宿主范围狭窄，只感染与人类亲缘关系接近的物种，如长臂猿与几种猴科动物[2]。与其他同科病毒一样，HBV基因组为部分双链结构环状DNA分子，其复制主要以RNA中间体的形式完成。HBV DNA这种逆转录的复制过程，在人类DNA病毒之中是独特的[2]。

(二)病原体描述：HBV的结构

HBV直径约为42 nm，是于宿主细胞核内复制的部分双链DNA病毒。由于HBV对于宿主细胞的损伤较小，故被HBV感染的宿主细胞一般不产生明显的细胞病理改变[2]。HBV病毒体的主要组分乙型肝炎病毒表面抗原(hepatitis B surface antigen，HBsAg)镶嵌于包被病毒核心的脂膜之中。自发现以来，Dane颗粒是HBV完整的病毒颗粒[3]。HBV的病毒核心由特殊的病毒核心蛋白抗原(hepatitis B core protein antigen，HBcAg)所包被，内含有单分子的部分双链DNA、HBV e抗原(hepatitis B e antigen，HBeAg)及依赖于DNA的聚合酶(图111-1a)。表111-1所列的术语用于描述HBV感染各个阶段相关的各类抗原与抗体。

HBV活动性感染的患者血清中可发现数量不同的3种形态的HBV病毒颗粒(图111-1a，b)。其中，数量最为丰富的颗粒(10^4～10^6倍)具有较小、多形性、球形及无感染性的特点(直径17～25 nm)，颗粒密度较低，反映了宿主细胞膜源性脂类的存在[2]。数量上较少的颗粒则以管状或细丝状为主，直径则与小颗粒较为接近。而数量最少的颗粒则为完整的HBV病毒体，直径为42～47 nm[3]。目前，尚无支持HBV复制的细胞培养体系[4]。

HBV基因组约有3200个碱基，包括重叠的基因结构(图111-1c)。病毒基因组负链含有4个可读框(open reading frames，ORFs)。这些基因编码结构蛋白(如HBsAg、HBcAg)，复制活性蛋白(聚合酶和X蛋白)，以及调节蛋白。该基因组结构紧凑，大部分序列对于其产生感染性是必须的[2]。

如图111-2所示，HBV感染肝细胞时先与低亲和力的硫酸乙酰肝素蛋白聚糖结合，随后与肝细胞特异性受体钠离子-牛磺胆酸共转运多肽(sodium taurocholate cotransporting polypeptide，NTCP)特异性结合[5-6]，诱导病毒颗粒进入其靶细胞[4,7]。当病毒结合到肝细胞之后，HBV便脱去衣壳使遗传物质裸露。部分双链的松弛环状DNA在宿主聚合酶的作用下，于细胞核内转化成共价闭合环状DNA(covalently closed circular DNA，cccDNA)。cccDNA是转录前基因组RNA(pregenomic RNA，pgRNA)与mRNA的模板[2]。pgRNA在细胞核内转录后，继而进入宿主细胞胞质内，成为HBV逆转录酶与核心蛋白的模板。与此同时，聚合酶将pgRNA转化为一种新的环状

*本章包含Rebecca T. Horvat和Ryan Taylor在本手册第11版第108章中呈现的部分内容

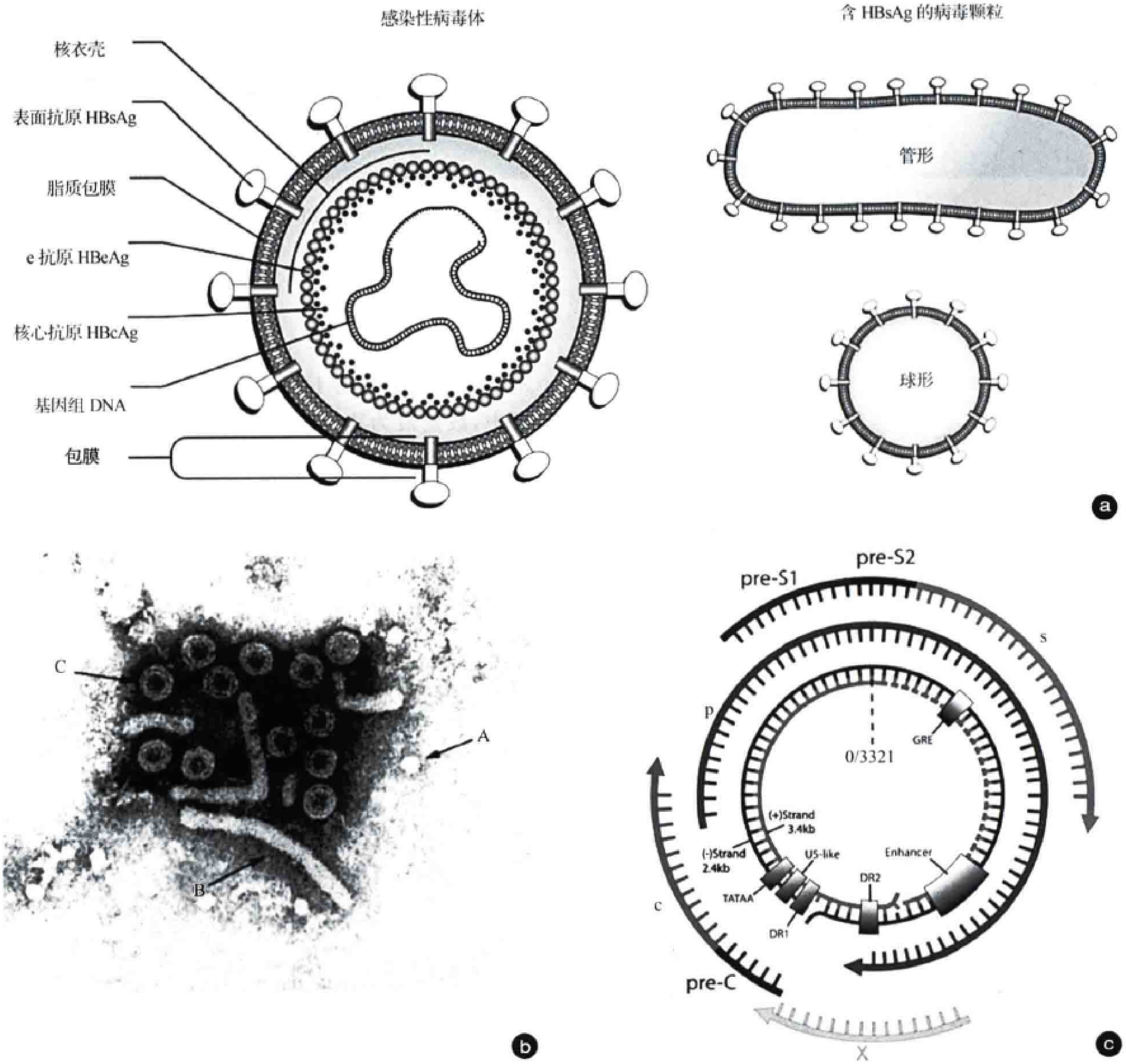


图 111-1 a. 完整的感染性 HBV 病毒体及空颗粒结构示意图。两类包含 HBsAg 的 HBV 颗粒(右)主要呈现管或条形、球形。这些颗粒的数量比完整的病毒体多(图由堪萨斯大学图形设计部 2009 年设计)。b. 电镜下所示的 3 种形态学实体,即直径 17～25 nm 的多形性球形颗粒(A);直径与小颗粒相近的管状或丝状颗粒(b);直径 42～47 nm 的双层球形颗粒,代表 HBV 病毒体(Dane 颗粒)(C)。c. HBV 编码区域的示意图,中央是 HBV 功能性基因组,为双链环状 DNA 分子,RNA 转录(箭头)的产生是来自于正、负 DNA 链模板。最大的编码区 P 基因区编码病毒聚合酶,而表面抗原的编码基因位于 3 个独立区包括前 S1,前 S2 和 S 区。核心蛋白的编码由 C 基因区完成,HBeAg 编码则由 HBV 核心基因完成。反式激活蛋白由 X 基因区编码(图由堪萨斯大学图形设计部 2009 年设计)

DNA 分子[4]。在感染早期,一些新合成的来自细胞质的基因组可返回细胞核内,参与构建与维持 cccDNA 池的稳定[2]。

HBV 基因组具有高效性,这是因为 HBV 基因组内每一个核苷酸都包含在至少一个可读框内。半数以上的基因组在至少一个可读框进行转录。4 种 HBV mRNA 参与蛋白质的翻译,这些 mRNA 分别来自 cccDNA 模板上不同启动子区域(图 111-1c)。最长的 mRNA 主要负责基因组的复制(pgRNA)及编码前 C、C(HBcAg)、聚合酶蛋白的翻译[2]。次长的 mRNA 则编码前 S1(39 kDa)、前 S2(33 kDa)和 S 蛋白(24 kDa,

表 111-1 感染和恢复期的不同阶段 HBV 的血清标志物[a]

感染分期	分子标志物	蛋白质抗原标志物		HBV 特异性抗体标志物			
				Anti-HBc			
	HBV DNA	HBsAg	HBeAg	IgM	总	Anti-HBe	Anti-HBs
易感期	−	−	−	−	−	−	−
潜伏期早期	+	−	−	−	−	−	−
潜伏期晚期	+	+	−/+	−	−	−	−
急性感染	+	+	+	+	+	−	−
急性感染的 HBsAg 阴性窗口期	−(<10^3 U/ml)	−	−	+	+	−	−
近期感染[b]	−/+	−	−	++	+	+	+++
既往感染[c]	−	−	−	−	+	+/−	+
携带者(免疫耐受期)	+++	+	+	−	+	−	−
携带者(免疫活跃期)	++(>10^5 U/ml)	+	−/+	−/+	+++	−	−
携带者(非活动期)	−(<10^3 U/ml)	+	−	−	+	+	−
HBeAg 阴性的慢性感染[d]	++	+	−	+/−	+	+/−	−
HBsAg 突变的感染[e]	++/+	−	+/−	+/−	+	+/−	−
低病毒载量的慢性感染[c]	−/+	−	−	−	+	+/−	−
疫苗接种反应	−	−	−	−	−	−	+
近期疫苗接种[f]	−	+	−	−	−	−	−

注：[a]−. 阴性；+. 阳性；−/+. 不定；++. 强阳性；+++. 极强阳性；HBsAg. HBV 外壳抗原以直径为 22 nm 的小球颗粒和管状颗粒形式存在；HBeAg. 通过细胞蛋白酶对前核/核心蛋白进行蛋白水解切割，并作为可溶性蛋白分泌于血清中。[b]此种情况也适用于处于早期恢复期的个体或 HBsAg 已转阴但 HBV DNA 仍然维持阳性的患者。[c]既往感染可见 Anti-HBc 抗体阳性而其他血清标志物阴性，包括 HBV DNA。这部分患者可能产生 Anti-HBs 抗体。有证据表明，这些患者可能在免疫抑制的情况下或丙型肝炎病毒治疗期间再次激活 HBV 感染。[d]尽管 HBV DNA 水平较高，但前核心或核心启动子区域突变可能导致 HBeAg 阴性结果。[e]HBsAg 变异或逃逸突变可能无法通过免疫测定检测到。[f]接种疫苗后 18 天血清中可检测到 HBsAg，透析患者 52 天也可检测到

HBsAg)。第三种 mRNA 编码前 S2、S 蛋白。最短的 mRNA 编码 X 蛋白，该编码产物主要作用为反式激活转录。成熟的 HBV 病毒体通过 RNA 逆转录为环状 DNA 分子产生。当长 mRNA 与聚合酶一起被包装至病毒的核心颗粒之中时，逆转录酶指导逆转录过程，新的 DNA 分子被合成。随后，这些颗粒被转运至宿主细胞的内质网内合成 HBsAg，然后再释放出细胞。对于球状或丝状颗粒，由于其缺乏 HBV 基因组或核心蛋白，是无效的 HBsAg 颗粒。因此，上述 HBsAg 颗粒可作为诊断指标，来反映病毒复制的活性[8-10]。

HBsAg 外膜蛋白主要由 HBV 基因组前 S 及 S 区编码的多肽构成。主蛋白是最小的多肽，由 S 区基因序列编码并且是糖基化多肽(图 111-1c)。中蛋白由 S 区和前 S 区共同编码，并存在额外的糖基化位点。大蛋白由前 S1、前 S2 和 S 区编码，包含 389～400 个氨基酸。HBsAg 的合成在 HBV 病毒体装配活动过程中是富余的，剩余的 HBsAg 则被释放入感染个体的血循环内，其中的球状和管状颗粒能被临床检测试剂所检测到，故而可作为 HBV 感染的主要标志物(图 111-1a, b)[11]。这些抗原可在初次病毒感染之后维持较长时期，在某些患者体内其数量可高达 10^{13}/ml。

另外两种 HBV 特异性蛋白——HBeAg 与 HBcAg，同样在 HBV 的诊断中发挥重要作用。这两种蛋白具有不同的抗原性，均可和 HBsAg 区分开来。HBcAg 是由 HBV C 基因区编码，*pg*RNA 翻译的多肽(图 111-1c)。在 C 基因区内的前 C 区内，存在 HBeAg 翻译的起始密码子[11]。由于起始密码子的不同，HBcAg 和 HBeAg 具有不同的抗原性，如 HBeAg 缺乏 HBcAg 所固有的 DNA 结合域。HBeAg 的前 29 个氨基酸残基由前 C 区编码，此部分 HBeAg 可引导蛋白质进入宿主细胞内质网。在内质网内，这种导向蛋白被分裂开，

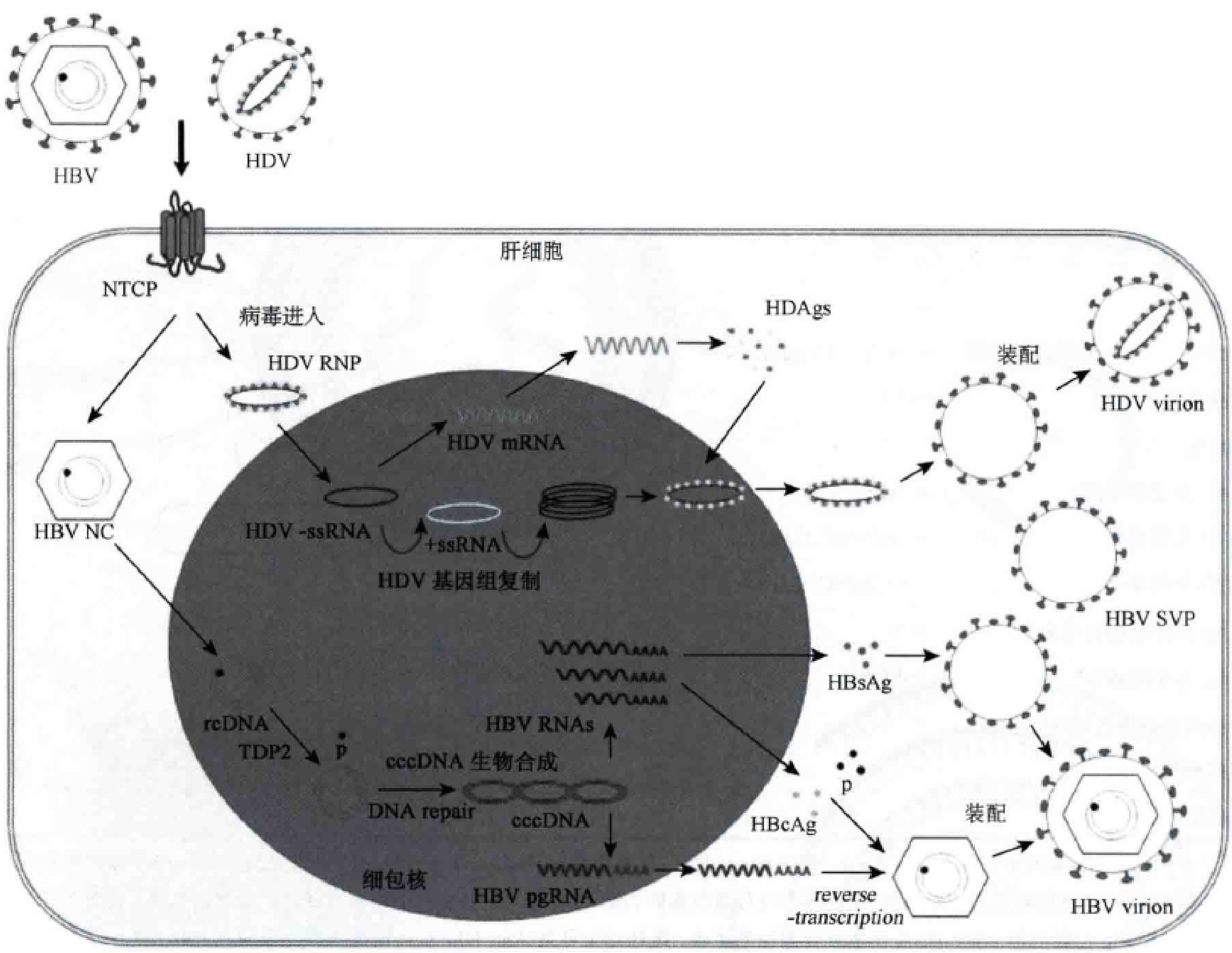


图 111-2 HBV 和 HDV 在肝细胞中的生命周期示意图。HDV RNP. HDV 核糖核蛋白;HBV NC. HBV 核衣壳;rcDNA. 松弛环状 DNA;-/+ ssRNA. 负/正单链 RNA;cccDNA. 共价闭合环状 DNA;HBV pgRNA. HBV 前基因组 RNA;HDAgs. 丁型肝炎抗原;HBcAg. HBV 核心抗原;HBsAg. HBV 表面抗原;p. HBV 聚合酶;HBV SVP. HBV 亚病毒颗粒;TDP2. 酪氨酰 DNA 磷酸二酯酶 2(经参考文献[4]授权同意,重印于此),见彩插

HBeAg 于是从宿主细胞释放入血。血液中的 HBeAg 可以可溶性蛋白质的形式存在,也可以与血浆白蛋白、α-1-抗胰蛋白或免疫球蛋白结合。血清中 HBeAg 可以作为完整病毒体存在的可靠指标并用于 HBV 的感染性的判断。在某些 HBV 病毒株中,可能产生前 C 区末端的碱基突变,致使终止密码子产生,阻止 HBeAg 的转录。这类突变可引起慢性乙型肝炎的病理改变,加速病情的急速改变[11-12]。此外,在 C 区、C 区启动子、外膜蛋白及聚合酶编码区,目前也已经发现不同的突变,比如外膜蛋白的突变体可能导致其抗原性改变,致使 HBV 疫苗的失效。这一类 HBV 也被称为逃逸株,感染这种逃逸株的患者体内无法产生可检测到针对 HBsAg 的抗体,对于乙型肝炎免疫球蛋白治疗也缺乏应答[11,13-14]。

(三)流行病学和传播

HBV 在全球范围广泛流行,是一个世界性的公共卫生问题。大约 30%的世界人口有现症或者既往感染 HBV 的血清学证据。据 WHO 估计,每年有近 60 万人死于急或慢性 HBV 感染[10]。2010 年,大约有 1/2 肝癌死亡患者归因于 HBV 感染,此外,1990－2010 年,世界范围内与癌症相关的死亡率上升了 62%,与肝硬化相关的死亡率上升了 29%[15]。

大多数 HBV 感染者来自于亚洲和非洲(图 111-3,请见原书 1909 页)。在这些感染者当中,近 1/4 在儿童期感染 HBV 的成年人由于 HBV 的慢性感染导致肝硬化、肝癌等严重并发症[10]。美国 CDC 估计,2015 年美国有 21 900 例新发感染病例,大

约有850 000人罹患HBV感染(https://www.cdc.gov/hepatitis/statistics/2015surveillance/commentary.htm)。美国大部分的感染发生在成年人中,这些人群慢性化的风险相对较低。但在美国以外的国家和地区,围产期阶段的感染更为常见且容易引发慢性乙型肝炎[10,16]。

最常见的HBV感染模式是垂直传播感染(围产期母婴传播),幼儿期与成年感染者密切接触导致的感染,性传播感染(包括异性恋、同性恋),毒品注射及其他和感染者体液的物理接触(如职业暴露、接受污染的血液制品等)[2,10]。HBV不会通过日常活动,诸如谈话、握手、拥抱,以及食物或飞沫等途径传播。

(四)临床意义

HBV感染肝细胞,既可以导致急性感染也可以引起持续若干年的慢性感染。在感染者中,亚临床肝炎表现症状轻或无黄疸,多数患者在感染早期并无临床表现。尽管如此,某些患者可以表现出较模糊的临床症状,例如,腹部疼痛、无黄疸的恶心(无黄疸性的肝炎),伴随黄疸的恶心(黄疸性肝炎)。HBV感染的后果有完全康复、致死性的暴发性肝炎,慢性病毒感染。从急性到慢性HBV感染的进展随年龄而异,在围产期、婴幼儿时期、成人HBV感染者中,分别约有90%、20%,以及<5%发展成慢性感染[17]。尽管不同时期及国际社会描述慢性乙型肝炎的术语多变,但慢性乙型肝炎的4个分期已得到普遍认可:①免疫耐受期;②免疫清除期;③免疫控制期;④再活动期(https://www.cdc.gov/mmwr/volumes/67/rr/pdfs/rr6701-H.pdf)[10,18-19]。

急性HBV感染的潜伏期为6周至6个月。在此阶段,感染可以呈现有或无临床表现的状态。新生儿感染则通常以慢性化,无临床表现的感染为主,而年龄稍大的儿童及成人通常在感染早期都以典型的无症状感染为主[2,10]。

急性HBV感染的症状通常较为温和,有时可能出现黄疸、褐色尿、陶土样便、肝肿大的体征[2,10,19]。一些患者会出现体重减轻、右上腹肝区疼痛、肝肿大且质地较软。急性HBV感染通常具有自限性,大部分患者在特异性抗体(anti-HBs)出现并清除病毒后可以完全恢复[10,19]。

急性HBV感染结局与年龄相关,大部分急性感染的患者是成人。急性肝损伤的主要机制是针对HBV感染肝细胞的宿主免疫反应,其可导致大量坏死并最终引起不可逆的肝损伤[10]。若不进行肝移植,暴发性的肝功能衰竭死亡率极高。一些患者肝移植后,发生移植肝脏的HBV再感染相当常见,并能继续在这些患者体内引起肝损伤,而乙型肝炎病毒免疫球蛋白(hepatitis B immunoglobulin,HBIG)与抗病毒治疗可以阻止该结局发生[19-20]。此外,包括退行性或再生性改变在内的急性肝损伤病理改变都可以引发肝小叶紊乱。围产期感染HBV的患者通常可对HBV抗原维持免疫耐受。这可以解释为何这类患者在保持高水平病毒的同时仍然不产生严重的肝脏病变[10]。慢性HBV感染是指可持续至少6个月在患者血清中检出HBsAg与HBV DNA[19]。慢性携带者可以终身维持HBsAg阳性,尽管也有一些HBsAg阳性患者可能自发产生anti-HBs与HBsAg血清学转化,但这些患者中的大部分仍将长期维持HBV DNA阳性的状态[2,10,18]。慢性乙型肝炎的症状往往缺乏特异性,可以在若干年以内都没有显著的临床表现。

大部分HBV感染者可进展至免疫活跃期,此时肝活检可呈现炎症及纤维化表现,故我们定义其为"活跃期"。这一病理表现主要来自于针对感染肝细胞中HBV蛋白持续性的免疫应答。慢性HBV感染最后一个阶段为非活动携带者期,此阶段的典型表现为低水平的肝脏炎症与转氨酶水平,通常处于这一阶段的患者发生肝细胞性肝癌(hepatocellular carcinoma,HCC)的风险较低[18]。

慢性HBV感染罹患HCC的风险增加[15,18,21]。在HBV感染过程中,病毒DNA可随机整合至宿主肝细胞基因组中。随着时间的推移,整合至宿主细胞的HBV DNA逐渐增加,并持续数年[19]。由于病毒DNA整合的随机性,细胞内的整合位点也将随时间推移而呈增加趋势[21]。随机整合的病毒DNA可以激活细胞的原癌基因,或抑制基因表达的调控。此外,某些HBV蛋白,如X蛋白和截短的前S/S蛋白,将成为有效的反式作用因子,这也是HCC患病风险增加的一个潜在机制[22-23]。同样,其他一些因素也与HCC发展密切相关,如吸烟、饮酒、感染其他嗜肝病毒(丙型肝炎)、黄曲霉素等[15]。

自1981年开始,安全、有效的疫苗已是防治

HBV 的主要手段之一。完整的 HBV 疫苗接种对于 95%以上的婴幼儿、小孩、年轻成年人都具有保护性[10,16]。疫苗所产生的保护作用可持续至少 20 年甚至终身有效。建议出生时、儿童时期和高危地区的成人普遍接种疫苗。已经或怀疑暴露 HBV 的非免疫个体应在暴露后尽快接种 HBV 疫苗，并注射乙型肝炎免疫球蛋白。2018 年 1 月，美国疾病预防控制中心免疫实践咨询委员会(Advisory Committee on Immunization Practices, ACIP)更新了美国预防乙型肝炎病毒感染的建议(https://www.cdc.gov/mmwr/volumes/67/rr/pdfs/rr6701-H.pdf)。目前，人们主要使用的 HBV 疫苗包括 2 种含 HBsAg 的 HBV 疫苗及 2 种联合疫苗(HBsAg 与其他疫苗联合)。乙型肝炎疫苗全程接种共 3 针，按照 0、1、6 个月程序接种。2018 年 3 月，免疫原性更强的佐剂 HBV 疫苗被批准用于成年人的接种，该疫苗仅需两剂，间隔 4 周，且可能对于免疫系统受损的患者更具免疫原性。Heplisav-B 疫苗的相关信息详见 CDC 网站(https://www.cdc.gov/vaccines/schedules/vacc-updates/heplisav-b.html)[24,25]。

慢性 HBV 感染者应终身服用抗病毒药物，治疗慢性 HBV 感染的目标是抑制病毒复制和延缓肝损伤的进展[2,10,26-27]。随着治愈丙型肝炎患者新型疗法的出现，人们也开始讨论“治愈”慢性 HBV 感染的意义[26,28-29]。当前，用于治疗 HBV 的药物可以分为 2 个种类，即聚乙二醇干扰素与核苷/核苷酸类似物。美国 FDA 已经批准核苷/核苷酸类似物如阿德福韦酯、恩替卡韦、替诺福韦，恩曲他滨和替比夫定用于乙肝的治疗[19,26-27,30]。2016 年底，美国 FDA 批准替诺福韦艾拉酚胺(一种替诺福韦前体药)用于治疗伴有代偿性肝病的成人慢性 HBV 感染。由于替诺福韦艾拉酚胺具有更高的血浆稳定性并能更高效地将替诺福韦递送至肝细胞，因此，可以较低剂量给药，每天 1 次即可，这可以改善肾和骨骼的实验室安全参数[31-32]。

随着 HBV 受体 NTCP 的发现[4-7]，科研工作者正在开发一种新型抗病毒药物——HBV 进入抑制剂，它们具有控制病毒和治愈的潜力[29,33]。与 NTCP 相互作用的小分子具有抗病毒活性，包括免疫抑制剂环孢菌素 A[33-34]。一种衍生于 HBV 的包膜且能与受体特异性结合的前 S1 肽(即 myrcludex B)，在细胞培养、动物模型和患者体内均存在显著的抗病毒效应[33,35-36]。

(五)标本的采集、运送和储存

HBV 感染的诊断，主要依靠检测血清或血浆中的血清学及分子标志物。所有由 FDA 批准的诊断试剂盒在其说明书中都有说明检测样本的特定要求。这些要求包含了样本类型、样本检测步骤和储存条件。总的来说，HBV 抗原和抗体在室温下可以稳定维持数天，在 4℃条件下可以储存数月，冻存于 −70～−20℃ 可以储存数年。尽管 HBV 血清标志物在 −70℃条件下可以稳定保存，但若反复冻融仍可能引起其破坏和降解。由于免疫检测过程中可能产生潜在的干扰信号，故应尽量避免采集溶血样本。

血清和血浆[EDTA 抗凝或枸橼酸盐抗凝(ACD)]都可用于核酸的检测[37]。不过为了保证结果的一致性，连续测试时应尽可能使用相同类型的标本及相同的试剂盒。根据试剂盒说明书的规定，应在 6～24 h 内分离血清或血浆，4℃可保存 3～7 天，−70℃可长期储存。大多数核酸检测分析不使用肝素抗凝血，因为肝素会干扰 Taq DNA 聚合酶介导的聚合酶链反应。目前有证据表明，多次冻融情况下 HBV DNA 仍然较为稳定，也不会导致检测敏感性下降[38]。干血纸片法和干燥标本的存储运输系统已成功用于 HBV 的血清学及核酸检测[39-41]。各类检测试剂的应用信息及批准时间可以在 FDA 网站检索查询(http://www.fda.gov/MedicalDevices/ProductsandMedicalProcedures/DeviceApprovalsandClearances/Recently-ApprovedDevices/default.htm)。

HBV 颗粒具有较强的抵抗力，可以在脱离宿主的环境下维持感染性至少达 7 天以上[37]。因此，样本溢洒与飞溅应该使用可吸水的材料吸附并使用恰当的消毒剂进行消毒。在进行溅出物清洁时应该佩戴好手套。实验室人员在进行操作时应该将所有样本都当作潜在的危险物[42]。目前已制定了血源性病原体职业暴露的职业安全与健康标准(Occupational Safety and Health Administration, OSHA)用于保护暴露于血液与其他潜在感染性物质的人员。OSHA 提倡为所有有潜在血源性病原体职业暴露风险的操作人员提供无偿的 HBV 疫苗。OSHA 标准与其他安全建议可在相关文件中查询。

(六)直接检测

HBV 的诊断主要依靠多指标的联合检测[43-44]。这些检测方法主要检测血浆或血清中特异性 HBV 蛋白质、核酸及特异性抗体(表 111-2)。

1. 显微镜检查 HBV 的电子显微镜下检查在疾病的临床诊断中并不起主要的作用。不过,肝活检仍常用于判断组织损伤及治疗效果。组织学检查对于急性肝炎、慢性肝炎及肝硬化的鉴别具有重要意义。

2. 抗原 在感染期患者标本中可检出几种 HBV 特异性蛋白。这些特异性蛋白可作为判断病毒复制水平的标志物。在 HBV 感染早期与慢性 HBV 感染过程中,可以在血清样本中检测出 HBsAg 和(或)HBeAg(表 111-1)。HBsAg 位于 HBV 颗粒的外表面,而 HBeAg 主要来自于 HBcAg 前 C 区 mRNA 的翻译(图 111-1c)。HBeAg 的功能与其在疾病发生过程中所起的作用目前尚未明确;不过,高水平 HBeAg 的检出可以说明 HBV 的高复制状态。HBsAg 与 HBeAg 均来自被感染宿主细胞的过量合成,在活跃感染期内两者均能在血清中被检测到[2,10,45]。血清中的 HBV 特异性抗原主要通过酶免疫法或化学发光免疫法进行检测。组织中的病毒抗原可通过免疫组织化学法进行检测。

检测 HBV 抗原需要拥有较高敏感性和特异性的检测手段。表 111-1 列举了 HBV 感染各阶段的主要检测指标。HBV 抗原的检测主要是固相检测,该检测方法可结合单克隆抗体并通过检测第二抗体结合后所形成的信号来诊断抗原物质。上述检测方法通常使用结构和大小不同的微粒子,然后在自动化仪器中实现结果分析[9,46]。抗原结合与检测是针对 HBsAg 抗原结构域特异性物质。目前常用的抗原检测方法,包括酶免疫检测、化学发光检测、免疫荧光检测等(表 111-2)。在某些研究中,HBV 核心相关抗原(HBcrAg)被认为是慢性 HBV 感染的新兴标志物,但目前仍处于研究阶段[47]。

3. HBsAg 血清 HBsAg 测定对于 HBV 感染的诊断至关重要。FDA 所批准的任一 HBsAg 诊断试剂只能用于诊断或献血、组织与器官捐献的检测。在进行 HBsAg 测定时应参照说明书"名字和适用范围"部分来选择适当的标本类型(表 111-2)。

从血清中检出 HBsAg 可说明患者处于 HBV 高度感染状态。患者在度过急性感染期后体内可产生 anti-HBs(参见下述血清学试验)。不过,当体内 HBsAg 仍然存在时,因 anti-HBs 和 HBsAg 产生结合可能使得 anti-HBs 呈现阴性反应。

对于所有商品化诊断试剂,HBsAg 阴性的标本无需进一步的检测。相反,HBsAg 阳性的样本往往需要重复数次以验证。这样的重复验证试验可以采用 FDA 所批准厂家提供的中和试验试剂。如果 HBsAg 阳性的血清可被 anti-HBs 所中和,则该样本应考虑 HBsAg 阳性;假如 anti-HBs 无法中和 HBsAg,那么 HBsAg 测定结果应视为不确定,应采集新的样本进行测定或按指南要求选择 IgM 抗 HBc 或总 anti-HBc 等血清标志物进行检测。

表 111-2 HBV 抗原、抗体血清学试验的商品化检测系统

厂家	试剂盒	检测方法[a]	检测指标	标本类型[b]	可报告的范围[c,d](抗干扰水平,范围)	批准用途[e]
雅培(Abbott Laboratories)	Architect	CLIA	HBsAg[f]、总 anti-HBc、anti-HBc IgM	血清、血浆(非柠檬酸盐抗凝)	定性	A
			anti-HBs	血清、血浆(非柠檬酸盐抗凝)	定性或定量(抗干扰水平:≥12 mU/ml;范围 4.23 到>1000 mU/ml)	A,D
	Prism	CLIA	HBsAg	血清、血浆	定性	C
			总 anti-HBc	血清、血浆(非柠檬酸盐抗凝)	定性	C
伯乐(Bio-Rad Laboratories)	Genetic Systems	EIA	HBsAg 3.0	血清、血浆和尸体血清	定性	B

（续 表）

厂家	试剂盒	检测方法[a]	检测指标	标本类型[b]	可报告的范围[c,d]（抗干扰水平，范围）	批准用途[e]
	Monolisa	EIA	总 anti-HBc、anti-HBc IgM	血清、血浆	定性	A
			anti-HBs PLUS	血清，血浆（柠檬酸盐抗凝可能导致值更低）	定性或定量（抗干扰能力：≥10 mU/ml；范围 2～1000 mU/ml）	A，D
索灵（DiaSorin）	ETI	EIA	HBsAg、总 anti-HBc、anti-HBc IgM	血清、血浆	定性	A
			HBeAg、anti-HBe	血清、血浆	定性	A
			anti-HBs	血清、血浆	仅定性（>10 mU/ml 阳性）	A，D
奥托临床诊断（Ortho Clinical Diagnostics）	Vitros	CLIA	HBsAg、总 anti-HBc、anti-HBc IgM	血清、血浆［肝素和（或）柠檬酸盐可降低某些 HBsAg 或 anti-HBc IgM 阳性样本的检测阈值］	定性	A
			HBeAg、anti-HBe	血清	定性	A
			HBsAg	血清	定性或定量（≥12 mU/ml 时阳性；范围 4.23～1000 mU/ml）	A，D
罗氏（Roche Diagnostics）	Elecsys	ECLIA	HBsAg Ⅱ[g]、总 anti-HBc、anti-HBc IgM	血清、血浆	定性	A
		HBeAg		血清、血浆		A
		anti-HBs		血清、血浆（仅限 EDTA 抗凝）	定性或定量（≥11.5 mU/ml 时阳性；范围 3.5～1000 mU/ml）	A，D
西门子（Siemens Healthcare Diagnostics）	Advia Centaur	CLIA	HBsAg、HBsAg Ⅱ[g]、总 anti-HBc、anti-HBc IgM	血浆、血浆（除了检测 HBsAg Ⅱ，其他不能用柠檬酸盐抗凝剂）	定性	A
			HBeAg、anti-HBe 1、anti-HBe 2	血清、血浆（非柠檬酸盐抗凝）	定性	A
			anti-HBs 2	血清、血浆（非柠檬酸盐抗凝）	定性或定量（抗干扰水平：≥12 mU/ml；范围 3.1～1000 mU/ml）	A，D
	Immulite	CLIA	HBsAg、总 anti-HBc、anti-HBc IgM	血清、血浆[e]	定性	A
			anti-HBs	血清、血浆（仅限肝素抗凝）	定性或定量（抗干扰水平：≥12 mU/ml；范围 3.0～1000 mU/ml）	A，D

注：[a] CLIA. 化学发光免疫分析；EIA. 酶免疫法；ECLIA. 电化学发光法。[b] 血清包括自血清分离管收集的标本；血浆包括 EDTA 钾、柠檬酸盐、肝素钠、肝素锂抗凝标本、血浆分离管收集标本，除非说明书规定用于特定试验。[c] 有关方法的所有信息均来自 FDA 指南和厂家试剂说明。[d] 所有有反应和（或）灰区结果和（或）临界值在报告结果前应该重复检测两次，相关内容见试剂说明。[e] A. 仅用于诊断；不得用于血液、血液制品、组织及献血样本的筛选；B. 用于血液、血液制品、组织及献血样本的诊断和筛选；C. 仅用于血液、血液制品、组织及献血样本的筛选；D. 用于疫苗接种后的应答评估。[f] 所有的试剂盒均需要重复 HBsAg 阳性的结果，并使用每种试剂盒特有的确证方法进行确认。[g] 检测 HBsAg 野生型和逃逸突变株

所有的 HBsAg 检测试剂都应保证，在特异性不降低的情况下可检测出亚纳克级的蛋白质[46,48]。对于诊断用途而言的试剂盒，这样的敏感性足以满足 HBV 感染活跃复制期患者血清的检测。然而，最近人们已注意到某些试剂对于主要抗原性区域发生突变的蛋白质缺乏检测能力。这些 HBsAg 突变体可能被常用检测试剂所漏检[9,13]，所以患者的初次检测应该纳入抗 HBs 与抗 HBc 两项指标，如有必要，还应采用分子生物学方法进行确证[9]。

HBsAg 主要的抗原决定簇被定义为“a”决定簇。这样的抗原位点是由一个含二硫键的结构所组成并使之呈现三维的抗原表位。在氨基酸位点 124 与 147 位之间的区域处于主要的蛋白亲水环之中[8,48-50]。鉴于现行的诊断试剂通常使用单克隆抗体来识别含特定免疫显性表位的 HBsAg，故而这些试剂盒可能无法检测主要抗原表位发生变化的 HBsAg。这些病毒株被认为是“逃逸突变株”。最早关于逃逸突变株的报道，来自于一名 HBV 阳性产妇所产的患儿，尽管该名产妇接受了疫苗与乙型肝炎免疫球蛋白相关治疗却仍然发生了 HBV 垂直传播[45]。这种突变病毒株 HBsAg 第 145 位氨基酸位点上的精氨酸变为甘氨酸。此单位点突变致使抗原结构产生改变，因而由疫苗所产生的抗体无法识别该抗原，突变的病毒得以继续保存在患儿体内。随之患儿的 HBV DNA 与突变的 HBsAg 又继续维持阳性达至少 12 年。在此之后，又有多个 HBsAg“a”决定簇的突变被发现。近期已有研究对多种诊断试剂盒检测 HBsAg 突变体的能力进行了评价，并发现一些诊断试剂盒对于某些 HBsAg 突变体存在漏检现象[45,48]。许多最新的诊断试剂盒已能够更好地检测突变体[如 HBsAg Ⅱ(表 111-2)][9]。不过，CDC 最近报道了一例血液透析患者，该患者经过多种商品化试剂盒检测均为 HBsAg 阴性，然而其 HBV DNA 水平却高达 14 200 000 U/ml[51]。

针对 HBV 抗原检测试剂对于献血样本 HBsAg 检测能力的缺失，大部分国家还会补充 anti-HBc 检测以筛选出潜在的 HBsAg 阳性样本。在美国，献血者的样本还将进行 HBV DNA 测定[48]。HBV DNA 及 anti-HBc 阳性，乃至 HBeAg 和(或)HBV DNA 阳性的个体可能携带有 HBV 逃逸突变株[49]。

有报道称血清 HBsAg 定量可作为预测慢性乙肝活动情况及监测疗效的有效标志物，目前已广泛应用于欧洲及亚洲，但仍未在美国应用[8-9]。HBsAg 水平被认为是 cccDNA 转录活性的替代指标，与 HBV DNA 复制和病毒载量无关。它有助于区分 HBeAg 阳性的患者是处于免疫耐受期还是免疫清除期，预测 HBeAg 阴性患者是处于非活动期还是自发性 HBsAg 清除期，以及鉴别 HBV 阳性的母亲是否处于母婴传播的最危险时期[52]。HBsAg 水平的测定对于聚乙二醇干扰素的个体化治疗至关重要[8]。随着新的抗病毒治疗方法的发展，这些方法以 HBsAg 清除作为“功能性治愈”的指标，血清中 HBsAg 定量可能成为强制性检测指标。HBsAg 的第三个国际标准可从 WHO 获得[53-54]。测量单位为 U/ml 的 HBsAg 定量检测仪器包括雅培公司的 Architect HBsAg、索灵公司的 LiaisonXL Murex HBsAg Quant 及罗氏公司的 Elecsys HBsAg Ⅱ。3 种方法比较结果表明，它们之间具有良好的相关性，但结果也清楚地显示了基因型和“a”决定簇变异体对 HBsAg 定量的影响[9]。商品化的定量检测试剂盒已经在欧洲使用，但尚未通过美国 FDA 的批准使用。然而，在撰写本文时，美国奎斯特诊断公司参考实验室提供了 Vitros 分析定量 HBsAg 的方法。

4. HBeAg　血清 HBeAg 作为病毒快速复制力的一项标志，往往伴随高水平的 HBV DNA。HBeAg 阳性患者有高传染性。然而，部分 HBV 病毒株由于前 C 区突变可引起 HBeAg 合成障碍，因此感染此病毒株的患者可在 HBeAg 阴性的情况下检测到高水平的 HBV DNA[49]。目前已经有一些可用于血清中 HBeAg 检测的商品化试剂盒。当样本中 HBeAg 的检测结果为阳性时，HBsAg 和 HBV DNA 的检测结果也应为阳性。否则，该结果应受到质疑，需进一步调查以确保报告前的正确性(表 111-2)。

5. 核酸检测　分子生物学检测方法定量 HBV DNA 被用于初步评估 HBV 感染与 HBV 慢性感染治疗的监测[43-44]。另外，如前文所提及，献血者常需检测 HBV DNA 以筛选出 HBV 感染早期阶段潜在的阳性者。

目前已开发出许多定量试剂盒来检测和监测患者 HBV DNA 水平，这些方法大多数是基于实时荧光定量 PCR 方法[50,55-59]。另外，有报道称环

介导等温扩增技术也可作为一种快速、灵敏的定性方法，该方法可用于资源有限的地区[60]。HBV DNA的监测可以很好地提示抗病毒治疗的效果并可作为评价抗病毒方案的重要参考指标。大部分试剂盒有较低的检测下限，可低达5～50拷贝/ml，检测上限则可高达10^{10}拷贝/ml。较宽的检测范围允许在感染早期实现HBV DNA的监测，也有利于判断HBV对抗病毒治疗的耐药情况（表111-3）[56]。近年来的研究表明，长期抑制HBV DNA是治疗成功的首要条件[19]，而在采取临床治疗后HBV DNA高水平的拷贝量往往预示着控制病毒复制的失败[26,44]。

现行的各类商品化HBV DNA检测试剂主要在检测限、线性范围、检测方法上存在区别（表111-3）。WHO于2001年颁布了国际HBV DNA标准以便更好地标准化HBV DNA定量结果[38,61]。当前，第三版WHO标准病毒制剂是高效价的A2基因型HBV（编码10/264），以0.5 ml无核酸酶的水配制时，定量值可达到$10^{5.93}$ U/ml。这项标准确定了1 U等量于5.4倍的HBV基因组拷贝数[62]。WHO标准使得各种诊断试剂盒的检测结果得以使用“U/ml”作为单位来报告。

然而，尽管这项标准具有较好的可用性，仍应考虑不同定量试剂盒之间由换算因素所引起的结果变异。因此，最佳的处理方式是患者在同一个实验室采用相同厂家的试剂进行持续的HBV DNA监测[43-44,56]。

某些HBV DNA定量结果的变异是来自于样本的采集与处理。大多数试剂盒采用的是血清或血浆（EDTA或枸橼酸盐抗凝）作为检测样本。不论使用何种采集管，所有检测样本都应在采集后4～6 h分离血清或血浆。对于所有FDA所通过的诊断试剂盒，都应在说明书中写入样本类型、处理方式、储存条件等内容。尽可能避免反复冻融，因为这可能降低试剂的敏感性。

大部分商品化HBV DNA定量试剂拥有涵盖8～9个$\log_{10}$数量级的线性范围，这保证受治疗患者或非活动携带者体内，从极低水平到10^7数量级的HBV DNA都能得到较为准确的检测。数项研究已显示，在最初治疗的6个月内HBV DNA水平下降2 $\log_{10}$数量级即可说明治疗是有效的[38,51,53]。

（七）分离程序

尽管HBV可以在体外条件下感染肝细胞，HBV的培养仍不作为常规的诊断试验。作为HBV/HDV进入细胞的关键因子[5-6]，NTCP的发现开启了一个新的研究时代，因为过表达NTCP的肝癌细胞对HBV和HDV易感[4]。这些研究进展将推动细胞培养模型的发展，并进一步提高人们对病毒-宿主相互作用及潜在的病毒特征的认识。

（八）鉴定

HBV感染的鉴定方法主要是联合应用分子、抗原、血清标志物来进行，如上述“检测指南”和下述“血清学试验”所示。

（九）分型系统

HBV抗原变异的自然发生是由于病毒基因具有异质性。根据这种多样的基因差异，可将HBV分为10种不同的基因型，40个基因亚型[63]。A～H基因型见（表111-4）。另外2个基因型I和J，尚有待国际病毒分类委员会的批准确认。当基因组的差异序列达到整体的8%或更高时，就构成了不同的病毒基因型[2,10,16]。目前已有明确的数据证实HBV基因型与疾病后果之间的联系。与慢性乙型肝炎相关性最为明确的HBV基因型是B和C型。携带B基因型病毒的患者更容易实现HBeAg的血清学转换，较少造成严重肝损伤。C基因型病毒在亚洲更为常见，其携带者被认为具有更高的肝硬化风险。然而，根据欧洲的研究，D基因型病毒比其他基因型更易引发活跃的肝脏炎症，其携带者往往自幼年便感染了HBV，且较其他HBV感染者拥有更加频繁的HBV暴露史[49]。目前尚不清楚各基因型HBV之间的差异是如何影响疾病后果的，其机制可能与基因差异导致病毒免疫表型变化或病毒复制关键控制基因的下调有关，比如病毒前C区、C区基因的突变。即便有了上述理论，HBV基因型在预测疾病与治疗结局方面仍未有定论。不过，在其他一些研究中，依据HBV基因型选择特殊的临床治疗方案将有可能变为现实[10,14,26]。

表 111-3 HBV 核酸检测的分子诊断试剂

厂家	试剂	检测方法	平台	标本类型	定量范围	敏感性[a]	批准用途[b]
雅培(Abbott Molecular)	Abbott Real Time HBV	实时荧光定量 PCR	M2000	血清、血浆(EDTA 抗凝)	$10 \sim 10^9$ U/ml	6.4 U/ml(血浆) 3.82 U/ml(血清)	A
豪洛捷(Hologic)	Aptima HBV Quant	TMA	Panther system	血清、血浆(EDTA、ACD 抗凝)	$10 \sim 10^9$ U/ml	4.8 U/ml(血浆) 5.9 U/ml(血清)	A
凯杰(Qiagen)	artus HBV PCR	实时荧光定量 PCR	Roto-Gene Lightcycler	血浆(EDTA、ACD 抗凝)	$10 \sim 10^9$ U/ml $10 \sim 10^{10}$ U/ml	3.8 U/ml 5.8 U/ml	A A
罗氏(Roche Molecular Systems)	COBAS AmpliPrep/COBAS TaqMan v. 2.0	实时荧光定量 PCR	Ampliprep/TaqMan Analyzer	血清、血浆(EDTA 抗凝)	$20 \sim 1.7 \times 10^8$ U/ml	20 U/ml	A
	cobas HBV	实时荧光定量 PCR	Cobas 4800 Cobas 6800/8800	血清、血浆(EDTA 抗凝)	$10 \sim 10^9$ U/ml	2.4(血清)-2.7(血浆)U/ml，样本量＜0.5 ml 时更低	A
	cobas AmpliScreen HBV	杂交、PCR 技术	Cobas Amplicor Analyzer	血清、血浆(EDTA 抗凝)，尸体	定性	4.41 U/ml(多次制备)；15.99 U/ml(标准制备)	B
	cobas TaqScreen MPX	多重实时荧光定量 PCR	Cobas 6800/8800	血清或血浆	定性	1.3～1.4 U/ml	B
基立福(Grifols USA)	Procleix Ultrio	TMA[c](多重)	Tigris		定性	8.5 U/ml	B
	Procleix Ultrio Plus	TMA(多重)	Tigris		定性	4.1 U/ml	B

注：[a] 所有试剂盒均声称可检测 A～H 基因型；Qiagen 和 Roche 分析法声称能够检测前 C 区突变。[b] A. 监测抗病毒治疗的应答；B. 筛查供血者或血液制品中是否存在 HBV DNA。[c] TMA. 转录介导的扩增技术

表 111-4 HBV 基因型与地理分布

基因型[a]	亚型及血清型	碱基个数	地理分布	疾病关系
A	亚型 A1,A2,A3;血清型 adw2,ayw1	3221	西班牙、波兰、美国、印度、巴西,以及中非和西北欧部分国家	老年患者患肝硬化、肝癌;C 区启动子突变(A1762T,G1764A)
B	亚型 B1-B6;血清 adw2,ayw1	3215	日本、中国、澳大利亚,以及东南亚部分国家	老年及年轻患者患肝硬化、肝癌;C 区启动子突变(G1896A)
C	亚型 C1-C4;血清型 adw2,adrq+,adrq-,ayr	3215	印度尼西亚、印度、澳大利亚、美国、巴西,以及亚洲部分国家	较B 基因型更易患肝硬化、肝癌前 C 区突变(G1896A)、C 区启动子突变(A1762T,G1764A)
D	亚型 D1-D4;血清型 ayw2,ayw3	3182	中东、印度、西班牙、美国、巴西,以及地中海地区	老年患者患肝硬化、肝癌;前 C 区突变(G1896A)、C 区启动子突变(A1762T,G1764A)
E	亚型未知;血清型 ayw4	3212	西非地区	未知
F	亚型 D1-D4;血清型 adw4q-,adw2,ayw4	3215	玻利维亚、委内瑞拉、波利尼西亚、阿拉斯加,以及中南美地区	儿童、成年人患肝癌
G	亚型未知;血清型 adw2	3248	澳大利亚、法国、德国、美国	几乎总是与其他基因型共同感染
H	亚型未知;血清型 adw4	3215	美国及中南美地区	未知

注:[a] 另外 2 个基因型 I 和 J,有待国际病毒分类委员会的批准确认

(十)血清学试验

HBV 特异性抗体的血清学试验主要用于评估 HBV 感染的各阶段及接种疫苗以后的体内免疫情况。随着宿主产生免疫反应,首先在体内形成的抗体为 anti-HBc IgM;此后相继出现总 anti-HBc、anti-HBe、anti-HBs[20](图 111-4)。有数种商品化试剂盒可用于 HBV 血清学试验(表 111-2)。

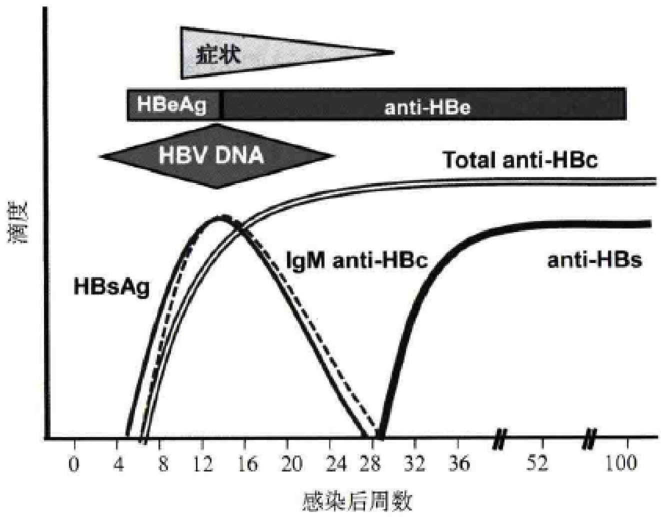


图 111-4 急性 HBV 感染痊愈患者的血清标志物出现的典型时间顺序

1. anti-HBc IgM 在感染的初期,anti-HBc IgM 可维持数周到数月。anti-HBc IgM 的检出可提示 HBV 感染期小于 6 个月(表 111-1)。在这个疾病阶段,患者的肝脏酶可能会升高。anti-HBc IgM 阴性可以排除近期急性 HBV 感染,但不能排除 HBV 的慢性感染[43-44,64]。患者 anti-HBc IgM 阳性显示为急性 HBV 感染,且患者通常可测到高水平的 HBV DNA[64]。在急性 HBV 感染的窗口期,在 anti-HBs 出现之前 HBsAg 已经下降到无法检测的水平,此时 anti-HBc IgM 阳性且是唯一的血清学标志物。在此期间,HBsAg 与 anti-HBs 结合为免疫复合物,因此两者均无法通过免疫法检测。

2. 总 anti-HBc 总 anti-HBc 阴性可提示患者无 HBV 的感染史。总 anti-HBc 阳性、HBsAg 阳性与 anti-HBc IgM 阳性是急性 HBV 感染;总 anti-HBc 阳性 HBsAg 阴性者可以是乙型肝炎恢复患者;总 anti-HBc 阳性、HBsAg 阳性是慢性 HBV 感染者(表 111-1)[24,64]。总 anti-HBc 在 anti-HBc IgM 消失后仍然可以在体内维持若干年。这种抗体的维持时间甚至比 anti-HBs 还要持久。因此,总 anti-HBc 是反映 HBV 暴露感染史的最

佳标志物。乙型肝炎疫苗不包含 HBc，则接受疫苗注射的人群体内不会产生 anti-HBc 除非在接种疫苗之前便已感染 HBV[65]。anti-HBc 单阳性且不合并其他任何一种血清标志物阳性者应考虑 HBV 感染[64]。出现这种血清学模式的同时病毒 DNA 水平为阴性或很低，应该考虑为既往感染 HBV[10]。因此，所有 anti-HBc 单阳性的患者应同时进行 HBV DNA 的检测。许多 anti-HBc 单阳性的患者可能会同时感染丙型肝炎病毒和(或)人类免疫缺陷病毒(human immunodeficiency virus，HIV)[66]。极少部分的 anti-HBc 单阳性可能是非特异性结果。

目前已有检测总 anti-HBc 的商业化试剂盒，并使用各种不同的方法和仪器(表 111-2)。所有的检测方法均使用重组 HBc 抗原来捕获抗体。

3. anti-HBs　anti-HBs 阴性，且不伴随其他血清标志物阳性，提示未感染 HBV 或尚未从 HBV 疫苗中获得免疫力。而阳性结果则反映受检测者已从 HBV 感染或疫苗中获得免疫力(表 111-1)。anti-HBs 定量检测已有商品化试剂盒，应在验证实验中使用。

anti-HBs 是接受疫苗及感染后机体免疫力形成的关键血清标志物。随着 HBV 免疫广泛的开展，这项血清标志物已被用于监测疫苗接种是否成功。WHO 与美国 CDC 均将 anti-HBs 水平＞10 mU/ml 作为机体产生保护性抗体的标志。然而，已有报道表明，尽管使用了国际标准，由一种商品化试剂盒所检测的 anti-HBs 水平尚不能和不同检测系统所检测到的数据进行比较[67]。因此，不同的商品化试剂盒设定的阳性水平值可能不同(表 111-2)。

对于婴儿、幼儿及大部分成年人，疫苗接种后不推荐检测血清 anti-HBs 的出现与否。美国 CDC 指出下列情况可例外，HBsAg 阳性母亲的新生儿、免疫缺陷的患者、透析患者、需要保证成功接种疫苗及时阻断 HBV 传播的卫生保健工作者[68]。

尽管疫苗可诱导产生 anti-HBs，但带有 HBsAg 突变的 HBV 逃逸株仍可导致 HBV 感染[49]。在这些情况下，HBsAg 和 anti-HBs 可能会同时在患者的血液中检测到[51]。

4. anti-HBe　anti-HBe 呈现阳性提示急性感染过程的结束，体内病毒的复制能力下降(表 111-1)。在急性感染过程中，这类抗体将和 HBeAg 发生结合，直至 HBeAg 水平完全下降时 Anti-HBe 才能得以检出。从急性 HBV 感染中康复的患者，体内将产生 anti-HBe、anti-HBc、anti-HBs。有趣的是，感染 HBeAg 阴性株的 HBV 患者仍可以拥有 anti-HBe[26]。

HBeAg 与 anti-HBe 检测结果的判读根据不同的检测原理而有所差别。通常，免疫法检测具有临界值或灰区。如果样品反复出现临界值，则应采集新的样本再次进行试验。

(十一)抗病毒敏感性检测

HBV 感染的治疗往往需要长期使用核苷及核苷酸类似物，而长期用药的缺点就是随后导致耐药发生。如前所述，HBV 通过 RNA 中间体进行复制，HBV 依赖 RNA 的 DNA 聚合酶在快速复制的过程中不具备精确的校正能力，继而导致频繁的复制错误。在药物的选择作用下，某些复制错误将导致耐药突变株的产生[26,69]。随着时间推移，携带 HBV 耐药突变的病毒株便成为体内的优势病毒种群。目前认为，体内 HBV DNA 较治疗时最低水平上升超过 $1\text{-}\log_{10}$ 的患者有必要进行抗病毒药物敏感性的检测[26,69]。

近年来，HBV 耐药突变的命名已得到标准化，以追踪耐药相关的基因突变及了解新型耐药突变[69-70]。耐药检测可以使用分子生物学方法检测已知的耐药突变位点，且这些方法目前已得到开展[12]。然而，对于检测结果的解释并非总是那么直观的。某一些耐药突变预示着多药耐药。比如单点突变 A181T 是和拉米夫定、阿德福韦酯、替诺福韦酯、替比夫定相关的耐药突变[12,71]。其他某些基因突变单独出现则并不导致耐药，但是一旦合并其他位点突变便可能引起耐药。许多单核苷酸的变化没有相对应的表型，可能代表在病毒复制过程中使用逆转录酶引起的随机遗传变化[69-70]。有关 HBV 抗病毒耐药性突变的更多信息，参见本手册第 114 章和 115 章。

目前尚无 FDA 批准的商品化体外诊断(IVD)试剂盒用于耐药基因分型的检测，但参考实验室可采用基因测序方法对耐药相关突变进行检测[72]。INNO-LIPA HBV Multi-DR 是一种线性探针测定法，在欧洲已用于临床诊断，但在美国仅用于科研。它主要采用膜结合的寡核苷酸代表

变异序列，并与生物素化的扩增子进行杂交。第二代线性探针检测方法可同时检测 HBV 野生型，拉米夫定、替比夫定、恩曲他滨、阿德福韦酯及恩替卡韦耐药相关的突变[73-76]。这种方法的主要缺点是每条带上反应曲线的读取较为困难(最高可达每条带 34 条线)，而弱条带的读取亦是一个难题。此外，有时已知的突变可以造成无条带的试验结果[74-76]。

第二种检测方法(Trugene HBV 基因分型试剂盒；西门子公司)目前作为科研专用，也已投入使用。该系统主要通过直接测序检测耐药突变，其中包括病毒处于低水平状态的标本[72,77-78]。测序技术与杂交技术相比较可体现高度的一致性[77]。

由各个实验室研发的多种检测方法也已用于耐药突变的检测。Sanger DNA 测序可直接用于检测此类突变。DNA 测序的优点在于其准确性，且 HBV 基因组任何片段上的突变位点都能被检测出[64,74]，而主要缺点包括缺乏敏感性，所测定突变病毒株占病毒群的比例需达到 10%～30%。这样的检测水平使得该技术不能完全鉴别出耐药突变，特别是当突变株小于 10%时[74]。二代测序技术目前也已被运用于检测抗病毒药物治疗过程中出现的耐药突变株[76,79]，这种突变株是以劣势株存在于患者体内。此劣势突变株虽然数量不多，但可以形成随机的基因序列改变并最终导致耐药出现。在治疗过程中，当患者需要采用不同治疗药物的时候便可以采取该方法，监测体内少量的 HBV 突变株[79-85]。

在一些研究与开发实验室中，表型试验也被用于 HBV 耐药的检测。这些方法通过使用分子、细胞技术及动物模型来检测药物敏感性，相对而言并不适用于临床。最近，过表达 NTCP 的肝癌细胞系已用于筛选靶向作用于细胞进入受体的抗病毒药物[86-87]。这些新型的细胞培养系统不但增进了我们对 HBV 生命周期的了解，而且还为抗病毒药敏试验提供了有力的研究工具。

(十二)结果的评价、解释与报告

HBV 感染可以导致几种不同的疾病结局，包括急性肝炎合并的暴发性肝功能衰竭及由慢性肝炎引起的肝硬化和肝癌。对于疑似病毒性肝炎患者的初步评估应包含各项实验室检测如血清转氨酶、直接胆红素和总胆红素、白蛋白和总蛋白、全血细胞计数、凝血试验、甲胎蛋白。HBV 检测与监测的特异性实验室检测包括病毒抗原检测、HBV DNA 的分子生物学检测及血清标志物。(表 111-1)。HBsAg、anti-HBc、HBV DNA 均阴性者属于非 HBV 感染者。

在一个典型的 HBV 急性感染过程中，HBsAg 可在肝脏酶升高至非正常水平及临床症状显现前 2～4 周应用免疫方法检出。如采用分子扩增方法，可在 HBsAg 出现之前、远早于临床症状出现之前检测到 HBV DNA。在急性 HBV 感染期间，一旦出现临床症状及血清转氨酶升高，这时候由于免疫反应引起肝损害，也可检测到 anti-HBc IgM 和总 anti-HBc。在这个阶段，病毒处于复制高峰期，HBeAg 也可能被检测到。大多数活动性 HBV 感染并康复的患者在 HBsAg 从血清中清除的短时间内即可获得抗 anti-HBs。随着疾病的康复或慢性化，anti-HBc IgM 的水平最终在数月内下降。图 111-4 表示一个 HBV 急性感染患者血清标志物变化的典型模式。

值得注意的是，如果在 anti-HBc 阴性的血液样本中检测到单一 HBsAg 阳性，这种情况往往不是早期 HBV 感染，而是由近期接种疫苗引起，因为 HBsAg 通常可在接种疫苗后 18 天内的血液样本中常规检测到，这在透析患者中甚至长达 52 天(https://www.cdc.gov/mmwr/volumes/67/rr/pdfs/rr6701-H.pdf)。因此，应咨询患者近期疫苗接种史，从而解释这种可能性。

结合实验室检查和临床体征可对慢性 HBV 感染的各个时期加以区分(表 111-1，图 111-5)。免疫耐受阶段通常出现在出生或幼儿时期感染 HBV 的患者。在这类感染人群体内往往能检测出高水平的 HBV DNA 与 HBeAg，提示存在较高的病毒复制力。尽管病毒复制水平高但不出现肝脏疾病，这便是免疫耐受的结果。然而，这种免疫耐受所体现的病理机制尚未明确。

当宿主免疫逐渐成熟之后，患者体内 HBV 特异性抗原表位将被宿主免疫系统所识别，HBV 感染便进展至免疫活跃期(同时也被称为 HBeAg 阳性的慢性肝炎期)，此时患者将出现免疫介导的肝损伤。围产期 HBV 感染的患者，通常在 20～30 岁实现免疫耐受期至 HBeAg 阳性慢性肝炎期的转变。在这个阶段，肝活检可见活动性炎症伴肝

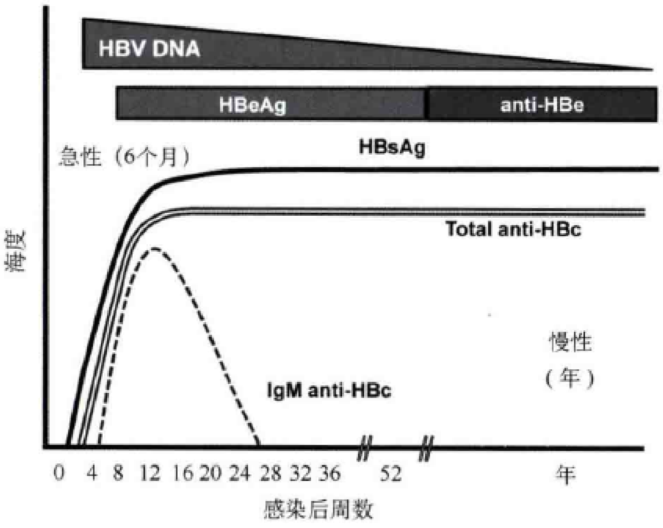


图 111-5 慢性 HBV 感染患者的血清标志物出现的典型时间顺序。在慢性 HBV 感染患者体内，HBsAg 和 anti-HBc IgG 通常将维持终身。HBeAg 则根据病情变化较为多变

纤维化。若 HBeAg 阳性持续，较高的 HBV 复制水平将引起活跃的慢性免疫应答，使得患者面临肝病持续进展的高度风险。这类患者体内 HBV DNA 水平与血清转氨酶水平都将偏高。HBsAg 阳性患者可以通过性、接触及围产期母婴传播等途径传播 HBV，而 HBeAg 阳性者具有最高的传播能力。

不过，若患者能顺利产生 anti-HBe，HBeAg 转阴，病情便可进入非活动携带者期（表 111-1）。免疫耐受期与活跃期的转化往往很难被察觉，这是由于 HBeAg 阳性的慢性肝炎患者，在临床上往往缺乏症状。非活动携带者期的主要特征是 anti-HBe 的血清学转换，以及在检出下限上下波动的 HBV DNA。anti-HBe 血清学转换往往与肝损伤缓解、血清转氨酶正常相关，在活检中可能见于较为轻症的肝炎。对于多数患者而言，这一阶段可持续多年。

部分非活动的 HBsAg 携带者（约 1/3）在 HBeAg 为阴性的情况下，仍将发展为慢性肝炎（HBeAg 阴性慢性肝炎）。这是因为这些患者感染了无法表达 HBeAg 的 HBV 突变株。此突变株的形成，主要由于 HBV C 基因区的前 C 或 C 区启动子区域产生突变。患有 HBeAg 阴性乙型肝炎的患者，即便体内 HBV DNA 水平较低，仍很可能罹患较为严重的肝病。

感染了 HBsAg 逃逸突变株的患者，HBsAg 检测可为阴性，但 anti-HBc 及 HBV DNA 呈现阳性反应。某些患者仅存在 anti-HBc 单一阳性，这可能是源于远期感染的隐匿性肝炎存在的唯一证据。这些患者，尤其是透析患者，应进行 HBV DNA 检测以排除低水平的携带者状态。

最新的研究进展表明，定量 HBsAg 可以作为肝内 cccDNA 转录活性的替代标志物，其水平与 HBV DNA 的复制无关，因此逐渐被认为是区分慢性 HBV 阶段的有用标志物[8-9]。因此，实验室诊断可用于 HBV 感染的预后和治疗评估。

anti-HBs 与 anti-HBc 的被动免疫往往针对现症或既往感染产妇所生的新生儿。被动获得的抗体通常在 3～6 个月内便逐渐下降，而感染激发的抗体往往可以稳定维持多年。考虑到献血标本都会进行 HBsAg 与总 anti-HBc 检测，上述这些 HBV 血清标志物的被动传播，在血制品中发生的可能性较低。

不伴 anti-HBc 阳性的抗 HBs 阳性者，主要是接种乙肝疫苗的人群（疫苗只含 HBsAg），其体内 anti-HBs 水平 ≥10 mU/ml 可视为具有保护性[80]。大多数接种 HBV 疫苗者将产生可被检测的 anti-HBs；然而，某些接种疫苗的患者由于存在 anti-HBs 的持续衰减，可能在检测中呈现阴性。这些人往往通过接受冲击剂量的 HBsAg 疫苗，可在 2 周内形成记忆性免疫应答。相关研究表明，接种疫苗者在体内 anti-HBs 消失后便可以感染 HBV，但 anti-HBs 的记忆性应答将使得感染较为迟钝，主要表现为肝损伤较为轻微，以及不表现临床症状。与之相反的是，一个 HBsAg 阴性的携带者在接种疫苗后将可能无法产生 anti-HBs。在首次接种疫苗后没有产生应答者应该在此基础上再补充接种第二剂疫苗。若二次接种仍然无法产生应答者，应考虑对 HBV 易感，需要在可能的 HBV 暴露之后给予 HBV 免疫球蛋白注射预防感染。另外，需要认识到的是，很多接种 HBV 疫苗无免疫应答者实际上是慢性 HBV 感染者。因此，这些在接种 2 剂疫苗后仍然无法产生 anti-HBs 的人群应该进行 HBsAg 及 anti-HBc 检测。

除了某些来自 HBV 基因型多样性较高地区的患者，HBV 基因型检测一般而言不是必需的（表 111-4）。虽然评估肝脏炎症活动状态及纤维化程度的“金标准”是肝组织活检，然而，肝纤维化的非侵入性评估已逐渐用于替代肝组织活检

(http://www. who. int/hepatitis/publications/guidelines-hepatitis-c-b-testing/en/)。

分子生物学方法主要用于检测 HBV DNA，对于新发患者病情状况的评估十分重要。这个指标亦用于抗病毒治疗效果的监测。HBV DNA 的减少程度是衡量治疗效果与预测疾病转归的重要标志。持续上升的 HBV DNA 水平与慢性 HBV 感染、肝硬化及患者死亡等后果密切相关。HBV DNA 定量的 WHO 标准对于 HBV DNA 监测的标准化十分重要，HBV DNA 检测结果以 U/ml 为单位进行报告。

抗病毒治疗的目的是阻止肝病变的持续进展。通常会根据是否存在肝硬化、丙氨酸转氨酶水平及 HBV DNA 水平来决定是否启动抗病毒治疗(http://www. who. int/hepatitis/publications/guidelines-hepatitis-c-b-testing/en/)。在治疗过程中，可以通过生物化学、病毒学、血清学及组织学检测结果来监测治疗效果。目前，对于病毒活动程度最为准确的监测指标是 HBV DNA，其检测方法具有很宽的动态范围。HBsAg 的消失，出现 anti-HBs 及长时间 HBV DNA 处于低水平抑制状态，都提示治疗效果的成功。即便接受抗病毒治疗，HBV 感染状态仍然有可能因为抗病毒耐药性而复发，因此，患者在接受治疗过程中应定期对 HBV DNA 的控制情况进行监测。HBV DNA 的良好控制是体现长期治疗成功的最可靠标志。

此外，对于 HBV DNA>200 000 U/ml 的孕妇，无论其丙氨酸转氨酶水平如何，均建议从妊娠晚期开始抗病毒治疗，以减少围产期传播的风险(https://www. cdc. gov/mmwr/volumes/67/rr/pdfs/rr6701-H. pdf)。所有的 HCC 患者均应该接受抗病毒治疗，对于有开始使用免疫抑制药物的慢性 HBV 患者，还应该预防性用药，以防止 HBV 再次激活。以直接抗病毒药治疗丙肝可导致合并感染的患者出现 HBV 的再次激活[88]，因此，如果治疗标准不符合要求，应对患者先行抗 HBV 治疗或定期监测其是否有 HBV 的再次激活(https://www. cdc. gov/mmwr/volumes/67/rr/pdfs/rr6701-H. pdf; http://www. who. int/hepatitis/publications/guidelines-hepatitis-c-b-testing/en/)。

处于抗病毒治疗中的患者，一旦 HBV DNA 重新上升超过 1 $\log_{10}$ 水平时，可能提示患者出现耐药。不推荐患者在治疗开始以前就接受耐药检测，即便其 HBV DNA 处于较高水平。耐药检测仅在患者接受药物治疗数月后，HBV DNA 仍然无法下降至少 1 $\log_{10}$ 水平时，才有必要进行。这一类患者可以被归类为原发性无应答者，应检测耐药突变情况以帮助选择合适的抗病毒药物。而要想让产生病毒学突破的患者获得理想的治疗效果，也有必要检测 HBV 耐药突变。

总之，实验室诊断对 HBV 的预防和治疗至关重要。因此，在所有资源配置中增加诊断方法的可及性和采用率对于减轻全球疾病负担有着重要的意义。主要策略包括使用干血纸片法进行检测，以及采用快速的抗原和分子检测方法，包括床旁检测(Point-of-care testing, POCT)[39-41,43](http://www. who. int/hepatitis/publications/guidelines-hepatitis-c-b-testing/en/)。然而，最重要的是要将患者与护理联系起来。

二、丁型肝炎病毒

(一)分类

丁型肝炎病毒(hepatitis D virus, HDV)是 δ 病毒属中唯一的一种病毒。HDV 未归类为病毒家族，因为它是一种独特的病毒，在 HBV 不存在时，HDV 便缺乏复制能力。因此，HDV 更接近于亚病毒颗粒而非真正的病毒[89-90]。1977 年，这种病毒首先报道于一个意大利患者，此患者在 HBV 慢性感染的基础上又发生了一系列急性感染的病症[91]。HDV 颗粒与一些植物亚病毒十分相像[92]。不过，HDV 与这些植物亚病毒之间仍然存在一些明显的区别。植物亚病毒通常无法编码特定的蛋白质，也不能利用宿主或类似 HBV 这样的宿主病毒[90,92-93]。

(二)病原体描述

HDV 大体上呈球形，直径为 36～43 nm，与 HBV 颗粒相比直径略小。1.7 kb 的 HDV 基因组仅仅编码一种蛋白质，即 HDV 的核衣壳蛋白，也是 HDV 的 δ 抗原(HDAg)。这种抗原是非糖基化蛋白，主要以 2 种形式存在：由 195 个氨基酸组成的 24 kDa 短肽和包含 214 个氨基酸的 27 kDa 的较长的肽链[90,93-94]。没有 HBsAg 的存在，HDAg 无法装配至病毒颗粒中。HDV 的 RNA 是由 HDAg 所包被，在此基础上再由 HBsAg 包

被。因此，对于完整的 HDV 颗粒，HDAg 是无法被检测到的。不过，感染的个体可以针对 HDAg 产生 HDV 抗体，且这种抗体与 anti-HBs 不同，其无法中和病毒颗粒[93]。

HDV 复制依赖于宿主细胞，而病毒基因组（和反基因组）充当核酶的作用，用于自我连接和切割[89-90]。与 HBV 相似，HDV 通过肝细胞特异性受体 NTCP 与肝细胞结合[7,89]（图 111-2）。HDV 的复制活动更依赖宿主的 RNA 聚合酶Ⅱ，而非 HDV 或 HBV 编码的 RNA 聚合酶[93]。HDV 唯一的固有酶活性是由 RNA 核酶所介导，核酶主要催化 HDV 环状 RNA 分裂形成线性化分子[95]。随后，HDV RNA 通过滚环机制进行自我分裂，从而进行复制活动[89,93]。

（三）流行病学与传播

在全世界范围内，有 1500 万～2000 万的 HDV 携带者[94,96]。某一些地区 HDV 的流行比较严重，这包括位于地中海沿岸、中东、中亚、西非、亚马逊河流域及南太平洋岛屿的国家[96]。在上述地区，HDV 倾向于人际间传播，如家人间的接触。此外，许多患者是在暴露于污染的针头及血液制品后感染 HDV。在 HBV 携带者较多的地区，严重的急性 HDV 感染也存在着持续性的流行趋势[94,96]。目前已发现 8 种 HDV 基因型，每种基因型都有各自独特的地理分布和结局[90,94]。世界各地都有关于 HDV Ⅰ型分离株的报道，而 HDV Ⅱ型主要分布在亚洲，包括日本和俄罗斯，以及中国台湾。HDV Ⅲ型仅分布在南美北部（秘鲁、委内瑞拉和哥伦比亚），并与严重的急性肝炎有关。中国台湾已有Ⅰ型和Ⅱ型或Ⅱ型和Ⅱb 型混合感染的报道[97]。

（四）临床意义

HDV 只能感染已携带 HBV 的个体，或伴随 HBV 一同传染至其他个体。这种共感染，主要发生在个体同时被 2 种病毒感染时，占全部感染案例的 2%（图 111-6）[93]。而重叠感染主要是已经患有慢性 HBV 感染的患者再次感染 HDV（图 111-7）[93]，这种情况占全部感染患者的 90% 以上[96]。急性 HDV 重叠感染相较于单独感染 HBV，其发生暴发性肝炎的风险来得更高。同样的，慢性 HDV 感染相对于单独感染 HBV，更容易导致持续快速的肝损伤[94]。

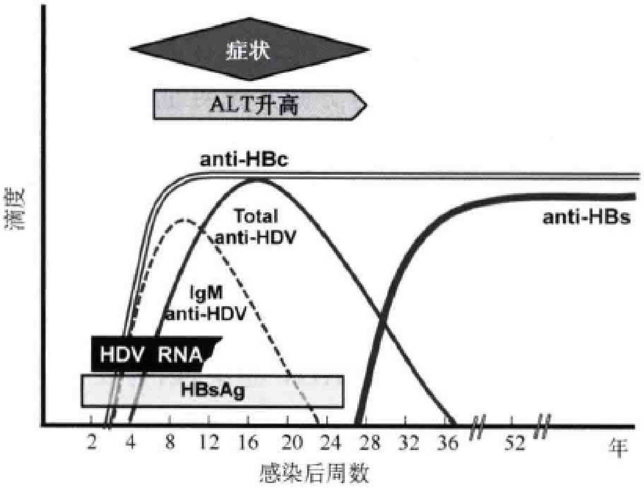


图 111-6 HDV 血清标志物时间序列（HDV 与 HBV 为共感染）

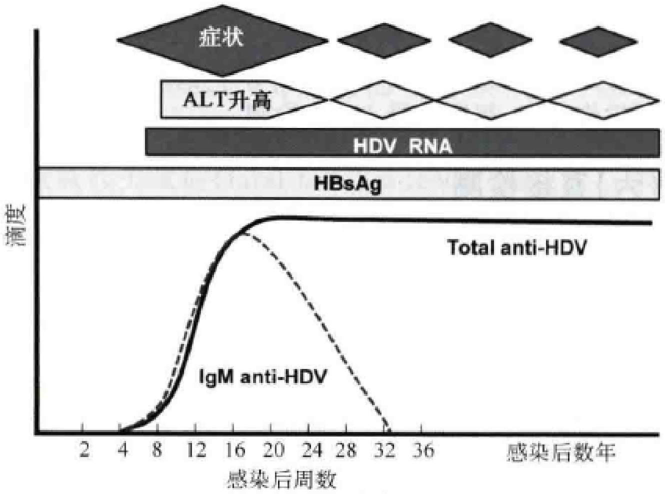


图 111-7 HDV 血清标志物的时间序列（HDV 与 HBV 为重叠感染），谷丙转氨酶（alanine aminotransferase，ALT）与临床表现可反映肝损伤及其临床表现的间歇性发展

在 HBV 和 HDV 同时感染的患者中，发生暴发性肝炎的比例约为 5%[93,96]。HDV 共感染过程有时可呈现两阶段性。HDV 感染通常不会导致急性 HBV 感染的慢性化，但可能使得无症状的慢性 HBV 感染急剧进展为暴发性或严重的肝病[94,98]。在慢性 HDV 感染患者中使用 γ-干扰素治疗，目前仅取得有限的效果。这种治疗方案需要高剂量和长期使用干扰素，且停药后容易复发[93-94,98]。HDV 感染合并肝硬化失代偿可以作为接受肝移植的适应证，且移植后预后较为良好[94]。

HBV 特异性核苷类似物无法抑制 HBV 的辅

助感染作用，用于研究HDV生命周期的实验系统的局限性均阻碍了HDV特异性药物的开发[94,99]。对于慢性HDV感染，α干扰素联合利巴韦林或拉米夫定的治疗方案并无明显效果[98]。然而，通过Myrcludex B阻断HBV/HDV特异性受体NTCP干扰病毒进入细胞[35,98,100-101]，以及通过lonafarnib[102-103]或核酸聚合物（如REP 2139-Ca）[94,104]阻断法尼转移酶抑制病毒的组装，在Ⅱ期研究中都取得了令人满意的结果。成功接种HBV疫苗也可以预防HDV感染，因为在没有并发HBV感染的情况下HDV无法进行复制。

(五)标本的采集、运输、储存

通过采集血清或血浆标本，检测其中的血清或分子标志物来对HDV感染进行诊断。HDV感染的疑似患者一般只来自于HDV高度流行地区，且必须合并HBV感染。对抗病毒治疗无应答的慢性乙型肝炎患者，或病毒载量低（HBV DNA<2000 U/ml）的肝损伤患者，都应接受HDV检测。

(六)直接检测

HDV的实验室诊断主要依赖于检测HDAg，或最近使用的血清及肝组织中的HDV RNA[93,105]。HDV RNA目前最常见的检测方法是逆转录实时PCR扩增技术[106-109]。虽然肝脏彩超、弹性成像和肝纤维化扫描仍是监测慢性HDV感染进展的有效方法，但HDV RNA水平下降通常表明其对治疗有应答[94,99,105]。目前，大型的参考实验室都可进行HDV RNA的定性和定量检测。

(七)基因型

测序已成为HDV基因分型的唯一技术。尽管目前尚不清楚HDV基因组的差异是否在疾病表现中起作用，但法国国家质量控制研究报告最近指出，不同临床实验室之间HDV IgM抗体及HDV病毒载量的结果存在差异可能与这种基因组的多样性相关[105,110]。

(八)血清学试验

HDV感染的诊断目前主要依靠商品化酶免疫检测试剂盒来检测总抗HDV抗体[106,110-111]。两种试剂盒包括DiaSorin（产自意大利）和Cusabio（产自中国）最近正在进行评估，并且可以通过商业途径获得[111]。HDV抗体阳性可提示急性或慢性HDV感染，随后应进行HDV RNA检测，以此确定感染是否处于活动状态。抗HDV IgM抗体可用于共感染及重叠感染的诊断。抗HDV IgM抗体的检测有助于判断疾病的活动并预测疗效[112-113]。

(九)检测结果的评价、解释与报告

最近，由于诊断方法的改进和新疗法的出现，再次引起了人们对HDV感染的关注。相比单独的HBV感染，HDV感染导致的肝病更加严重，如发展为肝纤维化的速度更快、肝癌的风险增加，以及出现早期失代偿性肝硬化和肝衰竭。HBV/HDV合并感染的早期诊断至关重要。HDV感染诊断的第一步是使用商品化试剂盒检测HBsAg阳性个体是否存在抗HDV抗体。对于抗HDV阳性的患者，还应检测血清中的HDV RNA，以此区分患者是属于现症HDV感染还是既往HDV感染。在患有肝病的HDV阳性个体中，区分急性HDV/HBV合并感染与HBsAg携带者重叠慢性HDV感染至关重要，从HBsAg阳性的慢性HDV双重感染者中区分出急性HDV/HBV共感染至关重要，这2种情况的病程、预后和治疗均不同。

可以通过检测一系列HDV和HBV的标志物来进行鉴别诊断，这些标志物在不同情况下有着不同的特征模式。标准化的商品试剂盒可用于抗HDV IgG抗体和IgM抗体的检测。大型实验室也提供了几种实验室开发的用于定性和定量检测血浆或血清中HDV RNA的方法。在解读这些分子生物学方法的结果时应当谨慎，因为它们尚未标准化，并且不同实验室之间的敏感性和结果可能会有所差异[105]。

参考文献请扫二维码查阅

第112章 朊　病

DANIEL D. RHOADS, JIRI G. SAFAR

（宁永忠　译；韩晓旭、芮勇宇　审校）

一、分类学

朊病(prion disease)[1]（译者注：prion 在词组中译作"朊"；单个词则译作"朊粒"），最开始名为传染性海绵状脑病(transmissible spongiform encephalopathies)[2]，是影响人和动物的致命性的神经退行性疾病。该致病病原的不同寻常的生物学、生物化学特征，最开始是在羊瘙痒症中得以识别。羊瘙痒症就是原型性的朊病[3]。疫苗生产时，为了避免病毒性疾病，通常使用的手段是福尔马林处理和热处理。然而，两者对羊瘙痒症的病原没有灭活作用，这意味着羊瘙痒症病原不同于一般的病毒(virus)。20 余年后，又证实了羊瘙痒症病原对放射线灭活的极度抵抗力[4-6]。啮齿动物的适应性疾病(rodent-adapted disease)中可传播的病原的部分提纯，导致发现是蛋白质在传播[7-10]，而针对核酸的清除或毁坏过程并不改变瘙痒症的传染性[1,5-6,11]。基于这些开创性发现，Stanley Prusiner 建议用"prion"命名这种蛋白质性传染性颗粒，以区分类病毒(viroid)或病毒(virus)，他因此获得诺贝尔奖[1,12]。目前大家接受的朊病的致病模式是，致病病原是一个错误折叠(misfolded)的蛋白质，标做 PrP^{Sc}，其中 sc 是瘙痒症(scrapie)的缩写，这个蛋白是一个正常细胞朊蛋白(prion protein) PrP^{C} 的致病性构象异构体(conformational isoform)。PrP^{C} 由宿主朊蛋白(host's prion protein, *PRNP*)基因编码[13]，所有健康哺乳动物细胞都有不同数量的表达。错误折叠的蛋白质可能有感染性——这个发现是一个新的生物学范式。尽管一开始被视作"胡说"，这个唯蛋白质模型(protein-only model)现在得到了大多数生物化学、遗传学和动物研究的支持[14-19]。包括近期体外蛋白重组获得感染性朊粒的成功[20-23]。大多数人类朊病都没有流行病学联系，所以都被描述为散发。不过在朊病发生过程中，环境和遗传暴露起到一定作用。朊粒可以引起羊瘙痒症、牛海绵状脑病(bovine spongiform encephalopathy, BSE)、鹿慢性消耗性疾病(chronic wasting disease, CWD)、人的多种疾病——GSS (Gerstmann-Sträussler-Scheinker disease)、致死性家族性失眠症(fatal familial insomnia, FFI)、库鲁病(kuru)、可变性蛋白酶敏感朊病(variably protease-sensitive prionopathy, VPSPR)、多种形式的克雅病(Creutzfeldt-Jakob disease, CJD)。

二、病原体描述

过去十年的显著进展为朊病的生物学和病理生理学提供了新的见解，并表明致病性和感染性的 PrP^{Sc} 构象主要由 β 片层(sheet)组成。PrP^{Sc} 能自我复制，即结合 PrP^{C} 的 α 螺旋单体，引起构象改变，导致 PrP^{C} 变为 PrP^{Sc}。这种构象改变有多米诺骨牌效应，导致更多的蛋白转换成这种低聚的(oligomeric)淀粉样蛋白(amyloid)形式的 PrP^{Sc} 状态，其二级结构以 β 片层为主[24-28]。尽管确切的结构性的中间步骤还不清楚，很多证据表明多种疾病和临床表现是由于 PrP^{Sc} 构象结构的变化[29-33]所致（见后述"流行病学和传播"）。

人的编码正常 PrP^{C} 的 *PRNP* 基因有 2 个外显子，其中第二个包含单独的可读框，编码 253 个氨基酸的前体蛋白[34]。N 末端和 C 末端信号肽，在内质网切开。C 末端链接糖基磷脂酰肌醇细胞膜锚，2 个多糖侧链链接在 181 和 197 号天冬酰胺

上[29-31]。正常的 PrP^C 含有5个甘氨酸的八肽(octapeptide)重复序列,由 *PRNP* 基因51~90密码子编码。密码子129编码蛋氨酸(methionine,M)或缬氨酸(valine,V)。这个多态性在疾病易感性和疾病表型方面扮演重要作用(见"流行病学和传播"部分)。

单体的 PrP^C 在α螺旋构象时,对蛋白水解降解(proteolytic degradation)很敏感。PrP^{Sc} 中存在很多β片层构象,导致对蛋白激酶K降解有抵抗作用。PrP^C 和 PrP^{Sc} 的这些特征,对朊病诊断有一定帮助(见诊断部分)。导致这些显著变化的构象转变,被认为会累及C末端区域的重新折叠,即 PrP^C 的α螺旋结构,被不同颗粒组装模式的β片层所取代[35]。虽然不溶性和抗蛋白酶性是 PrP^{Sc} 的初始定义特征,但对蛋白酶敏感的致病性 PrP^{Sc} 小寡聚物的发现,显著拓展了人们对致病性构象谱的知识[36-37]。这些发现导致新的动物和人类朊病的发现,如羊的不典型瘙痒[38]和人的VPSPR[39]。

在健康个体,PrP^C 是一个膜相关糖蛋白。从进化角度和ZIP金属离子转运蛋白家族有相似性[40]。八肽重复序列的灵活性与结构和锌离子、铜离子转运相一致,更有助于达到不同的生物学作用[41]。尽管此前累积的数据提示,PrP^C 在 PrP^{Sc} 毒性中起到了必不可少的受体作用,也是 PrP^{Sc} 转换的底物[42-43],PrP^C 确切的生理学作用还有待进一步明确[44]。PrP^{Sc} 可变的神经毒性、特异性的感染性,逐渐增多的新确定的朊病缺乏淀粉样纤维形式(amyloid fibrillar forms)[39,45],导致一些研究者质疑与 PrP^{Sc} 之间的病因性关联,并预测假定有致死性的PrPL亚型,与毒性、疾病的阶段性症状表现相对应[46-47]。PrPL有待实际发现,而近期实验显示,CJD朊粒高度重复的潜力,与脑部低聚性 PrP^{Sc} 的水平相一致,与人类朊病体内的疾病进展相一致[31-32]。该低聚性种类 PrP^{Sc} 水平的升高,会将无症状的朊粒感染平台期,转换为有症状的阶段[48]。综上,近期数据支持小 PrP^{Sc} 颗粒控制着朊粒转换、控制着 PrP^C 介导的细胞毒性效果,它们代表着以前假定的PrPL种类。

三、流行病学和传播

人类朊病多数是散发的。有一些可以归结为 *PRNP* 突变,也有一些是动物疫源获得或医源性传播(表112-1)[30]。朊病包括:变异性CJD(variant CJD,vCJD)、GSS、FFI、库鲁病、VPSPR、临床上与组织学上多种形式的散发CJD(sporadic CJD,sCJD)。人类朊病无法治疗和恢复,特征如下:致病性朊蛋白(PrP^{Sc})沉积在脑部,多位点的神经病理特征伴神经元丢失、海绵样改变、星形细胞增殖[30,49]。一般而言,CJD发生率为每年每百万人口0.5~2.0例。在特定年龄群体,美国近期全国病死率调查显示,65岁及以上人群发生率为每百万人口4~6例[50]。过去十年,英国(http://www.cjd.ed.ac.uk/sites/default/files/report24.pdf)和美国(https://www.cdc.gov/prions/cjd/occurrence-transmission.html)各自观察到的CJD经年龄校准的发生率的增加,提示有非年龄因素,但到目前为止还未确认。

表112-1 人类朊病的类型

病因	表型
获得性	变异性克雅病
	医源性克雅病
	库鲁病
散发性	散发性克雅病(sCJD)[a]
	sCJD亚型129 M/M(或M/V)1
	sCJD亚型129 V/V 1
	sCJD亚型129 M/M 2
	sCJD亚型129 M/V 2
	sCJD亚型129 V/V 2
	致死性失眠症
	各种对蛋白酶敏感的朊相关病(prionopathy)
遗传性	遗传性克雅病
	致死性家族性失眠症
	GSS病(Gerstmann-Sträussler-Scheinker disease)

注:[a]sCJD亚型分类依据是 *PRNP* 密码129氨基酸[即蛋氨酸(M)和(或)缬氨酸(V)]和抵抗蛋白酶K的朊蛋白迁移类型(图112-1)[108]。

(一)散发克雅病(sCJD)

散发形式CJD囊括了85%的所有人类朊病。针对其病因,提出了若干假说进行解释。① *PRNP* 基因在体细胞内存在散发性突变。突变导致 PrP^C 的产生,很容易转换为 PrP^{Sc}。该病理生理学等同于遗传性CJD(genetic CJD,gCJD)的

病理生理学。②PrP^{C} 结构出现了罕见的随机性(stochastic)构象改变，导致散发性产生 PrP^{Sc} 构象体，它可以增殖[51]。③至少一些表面上的 sCJD 病例，实际上是因为暴露于隐蔽的、低水平的"共同的外部因素"，当然该因素还没有确定，才获得了 CJD[52]。以上 3 个解释，预先支持 PrP^{Sc} 能够吸收野生型 PrP^{C}；该过程通过突变或构象改变发生[53]。④小数量 PrP^{Sc} 样异构体正常存在于脑部，其他蛋白(如热休克蛋白)与之结合，可以阻止 PrP^{Sc} 致病。随着年龄增大，这种保护机制消失[54-55]。

已经报道了一系列 *PRNP* 基因多态性[56-57]。研究最多的发展为 CJD 的风险调节子(riskmodifier)之一，是 *PRNP* 密码子 129。密码子 129 蛋氨酸纯合性(homozygosity)是发展为 sCJD 的风险因素，而密码子 129 缬氨酸有一定保护性[49,58-59]。世界范围内这种多态性是可变的。亚裔个体，129M 等位基因的频率是 0.97[60]，而欧裔是 0.65[57]。在库鲁病流行区，缬氨酸变异性轻度高于蛋氨酸等位基因的流行率[57-58]。

(二)遗传性朊病

有多种遗传性朊病，包括 gCJD、GSS、FFI。已经确定了多个 *PRNP* 突变，与这些遗传性朊病相关。其突变是错义或无义的点突变，或者突变会导致 PrP 中富于甘氨酸的八肽重复序列的数量(见病原体描述部分)[57,61-62]。其中一些疾病有独特的组织学特征和临床表现。等位基因确定了 16 025 个确诊(difinite)与极似(probable)朊病病例，涉及 9 个国家，报道了 59 个 *PRNP* 变异，不过这些变异多数未知，或外显率(penetrance)很低，在普通人群也存在[56]。和 gCJD 相关的最常见突变是 E200K *PRNP* 突变，临床表现和 sCJD 不一样[57]。FFI 和 GSS 报道充分[63]。和 FFI 相关的 *PRNP* 突变是 D178N[64]。一些致死性失眠患者不是 FFI，和 *PRNP* 突变没有关联，此时报道为散发性致死性失眠[64]。一系列 *PRNP* 突变与 GSS 有关，其中的典型突变是 P102L。遗传性朊病的症状体征，典型情况是出现在 50 岁之后。

(三)获得性朊病

获得性朊病中库鲁病的研究最充分。在不久的从前，巴布亚新几内亚的法尔人实行 endocanabalism 作为他们死亡和哀悼仪式的一部分[65-66]。通过这些仪式盛宴，引起库鲁病的朊粒在部落中传播，主要传播给妇女和儿童，因为她们是盛宴的主要参与者。与其他群体相比，法尔人的 129V *PRNP* 等位基因频率更高。在 *PRNP* 129 密码子上具有甲硫氨酸缬氨酸杂合性，且发展为库鲁病的法尔人个体，在生命历程中疾病出现的晚，并且发病后症状的进展比其他纯合子基因型慢[67-68]。此外，一种新的 PrP 变种 G127V 在杂合子状态下对疾病具有很强的抵抗能力，在库鲁病流行期间可能正处于正向的进化选择阶段[69]。部落内 endocanabalism 的停止，也终止了库鲁病的流行。而对库鲁病和法尔人的研究显示，朊病从传播获得到出现症状，潜伏期可长达 50 年[70]。

vCJD 的获得是因为人接触了 BSE，BSE 有时被称为"疯牛病"，是一种牛的朊病，类似于羊瘙痒症和人类的 CJD。有 BSE 的牛可以将朊粒传播给人类，导致人类朊病，这种朊病称作"新变异 CJD"或"变异 CJD"[71-73]。vCJD 最早于 1996 年在英国发现，截至 2017 年 4 月，英国共报告了 178 例极似(probable)和确诊(definite)病例。另有 53 例在英国以外 11 个国家的居民中确定，包括美国的 4 例。来自美国居民的 4 例 vCJD 病例的流行病学证据表明，他们是在英国(2 例)、沙特阿拉伯(1 例)和科威特或俄罗斯(1 例)感染的[74]。

20 世纪 80 年代英国暴发 BSE，据信源自用从动物尸体(包括含有朊粒的神经组织残余)生产的富含蛋白质的副产品对牛的饲养[71]。随后，20 世纪 90 年代英国暴发 vCJD[71-73,75]。进展成 vCJD 的个体，通常比那些受到 sCJD 影响的人更年轻。此外，有 3 例 vCJD 患者可能是通过治疗性输血获得该病的，这些输血来自临床前 vCJD 患者捐献的血液制品[76-77]。

动物研究表明，所有的密码子 129 基因型都容易发展成 vCJD[78]。然而，直到 2016 年，vCJD 都只见于在 PRNP 密码子 129 上蛋氨酸纯合的个体[79]。因为暴露后数十年仍有发展成可传播的朊病的潜力，所以对 M129V PrP 个体暴露在 BSE 时，以下 2 项仍然不确定：是完全不会发展为 vCJD，还是他们在出现症状前只是有一个较长的潜伏期，类似库鲁病。值得关注的是，杂合子的 vCJD 潜伏期可能比甲氨酸纯合子长。2017 年发

表的一篇单一病例报告，描述了首例 vCJD 患者有杂合的 *PRNP* 密码子 129[80]。目前，尚不清楚该病例是否代表将在 *PRNP* M129V 个体中发生的 vCJD“第二波”中的第一个病例，或者该病例只是一个非典型的孤立病例。

最近发现了非典型（H 型和 L 型）BSE，世界范围内报道频率相当，但主要发生在年老的牛身上，因此很难检测这些非典型的形式[81]。这种疾病的起源尚不清楚，但从实验性人性化转基因数据（experimental humanized transgenic data）推断，L-BSE 可能会作为一种未被识别的 sCJD 在人类中传播[82]。

除了 BSE，另一种可能引起美国公共卫生领域关注的朊病是鹿和麋鹿的慢性消耗性疾病 CWD。这些养殖和自由放养鹿的 CWD 在科罗拉多和怀俄明地区已经流行了几十年，但自 2000 年以来，在另外 19 个州、加拿大 2 个省、韩国和挪威[83]也发现了这种疾病。与牛 BSE 的暴发不同，CWD 朊粒在牛科动物中具有高度传染性，而且这种疾病很容易通过接触和接触环境中的 CWD 朊粒（例如，通过鹿科的粪便）而在动物之间传播[84]。没有报告表明人类暴露于 CWD 朊粒可导致疾病[85-87]。实验证据表明，存在一种防止 CWD 传播给人类的物种屏障，但尚不清楚这种物种屏障的保护程度，因为其他灵长类动物没有受到保护。多达 100%的脑内和 92%的经口接种的松鼠猴在接触 CWD 朊粒后发生朊病[88-89]。动物朊病，如 BSE 和 CWD，可能直接或通过中间动物宿主间接传播给人类，这已导致持续性的公共卫生监测。鉴于目前的高度不确定性，这些公共卫生努力是积极的和预防性的[83]。

医源性 CJD（iatrogenic CJD，iCJD）是朊病通过治疗性使用受朊粒污染的人源制品或受朊粒污染的可重复使用设备传播的结果。200 多例 sCJD 的医源性传播归因于使用来自尸体脑垂体的生长激素，200 多例归因于受污染的硬脑膜移植物[77,90]。自从发现朊粒通过尸体生长激素和硬脑膜移植物传播以来，已经采取了措施防止个体通过人源治疗制品进一步接触朊粒。虽然 vCJD 似乎可以通过治疗性输血传播，但通过输血传播的 sCJD 尚未确定为传播途径[76]。大约 12 个 iCJD 病例是由不常见的传播事件引起，包括神经外科器械、脑电图针和角膜移植[77]。由于通过暴露于神经组织的可重复使用的仪器传播朊粒的可能性，指南建议如果疑似暴露于朊粒，要对这些仪器进行隔离和（或）更广泛的消毒和（或）销毁（见消毒部分）。

（四）医疗机构朊粒的传播

潜在的朊粒传播引起关注有几个原因。首先，朊病并不常见，所以很多人对朊粒的传播只有粗略的了解。第二，实验室研究表明，标准的消毒和灭菌过程可能不足以完全消除朊粒污染仪器的传染性。第三，关于朊粒如何传播、如何不传播的不确定性仍然存在。例如，vCJD 似乎可能通过输血或摄入受污染的牛肉产品而传播，但 sCJD 似乎只能通过侵入性接触（如神经外科或接触来自神经组织的尸源制品）而传播。第四，朊粒暴露/传播与症状学之间的潜伏期可能长达数十年，因此很难明确地得出某些（或可能的）朊粒暴露不会导致疾病传播的结论。第五，没有预防或治愈朊病的方法。

尽管对卫生保健专业人员的一项大规模流行病学研究得出了结论，这些数据并不支持卫生保健工作者职业风险的任何总体增加[91]，但在卫生保健环境中应更加谨慎，特别是对神经外科患者。美国 CDC 和 WHO 设计了风险评估和消毒流程，防止朊病的医源性传播（参见消毒部分），但可能接触朊粒的不幸事件仍然在美国发生[57,92]。BSE 暴露后 vCJD 的经验和库鲁病（kuru）的经验表明，暴露与可检测到的人朊病之间可能会延迟 10 年或更长时间，因此，短期的人类结局不能用来衡量朊粒感染控制措施的有效性。朊病的这些特点，回顾性流行病学研究的方法局限，支持采用保守的方法来维持当前的预防措施[92]。

四、临床意义

人类朊病通常散发。但可通过医源性和兽源性途径传播给人类，潜伏期长达数十年，普遍致命。这些特点的组合，使朊病成为公共卫生监测的重要部分。临床表现的多样性使朊病很难与其他与年龄相关的脑神经退行性疾病相区分，而尸检后的大脑分析是目前诊断朊病的“金标准”[93-95]。最近放射影像学和临床实验室检测方

面的进展显著提高了生前检测的预测价值(见鉴定部分)。

CJD的潜伏期可能是几个月到几十年。不过一旦出现症状并确诊,其病程通常包括神经精神遽衰,可以经典地描述为“快速进行性痴呆(rapidly progressive dementia)”,并在几个月内死亡[49]。目前还没有预防sCJD或遗传性朊病的方法(在携带*PRNP*突变的个体)。除了支持性处置外,目前还没有针对CJD的特异性治疗。

sCJD临床表现多样,包括快速认知退化、运动障碍、睡眠障碍、视觉症状、行为变化和精神变化[96]。该病通常在死亡前发展为肌阵挛性和不动性缄默症(myoclonus and akinetic mutism),通常在确诊后6个月内发生[97]。

遗传性朊病可因潜在的遗传突变以不同的方式表现出来,症状过程通常比sCJD长几个月到几年,而且进展更慢。FFI典型表现为包括失眠在内的睡眠障碍。GSS典型表现为小脑功能障碍的体征和症状,如共济失调。

暴露后数月甚至几年都可能出现iCJD。当朊粒直接传播到大脑时,观察到iCJD潜伏期较短,而当朊粒通过外周接种传播时,观察到潜伏期较长。

vCJD比sCJD更影响年轻群体。诊断为vCJD的人通常在30岁左右,但年龄范围很广。vCJD通常表现为精神症状,并在12～18个月的病程中发展到死亡[49,92]。

朊病的鉴别诊断包括:通常为慢性和缓慢进展的快速进展型痴呆、自身免疫性疾病、血管疾病、代谢性疾病、维生素缺乏、恶性肿瘤和感染[98]。

五、标本的采集、运输和储存

在采集和处理可能含有朊粒的标本时,必须采取标准预防措施。用于收集标本进行朊粒检测的手术器械最好在使用后丢弃。另外,应该使用已知灭活朊粒的方法对仪器和设备进行消毒[99](见消毒部分)。美国CDC《微生物学和生物医学实验室的生物安全》第五版,建议“在BSL-2机构中采用BSL-3实践方式,对含有人类朊粒的未固定的大脑、脊髓和其他组织标本进行极为小心的处理”[100]。标本如用于基因检测的血液、用于诊断检测的脑脊液和活检及尸检大脑,应根据参考实验室的规程储存、运输。神经组织切片进行组织病理学分析时,应按照美国病理学家学会(College of American Pathologists,CAP)的建议进行运输和处理,其中最理想的方法是在石蜡包埋前对组织进行甲酸消毒[101]。标本的运送应由受过训练者按照政府规定进行。美国朊病病理监测中心(National Prion Disease Pathology Surveillance Center)推荐将所有标本作为UN 3373 B类材料运送[102]。

消毒 临床微生物学实验室常用的常规消毒方法不能灭活朊粒。例如,在酒精固定、福尔马林固定、高压灭菌,甚至干热焚烧标本化为灰烬,朊粒仍可保持感染性[103]。虽然朊粒经过严格处理后仍能保持传染性,但自20世纪70年代以来,尚未发现朊粒通过受污染的外科设备导致医源性传播,也没有发现来自可能受污染表面的朊粒的人际传播[99]。(译者注:焚烧炭化仍有感染性?有待确证。)

中枢神经系统(CNS)组织是已知的可传播朊粒的滴度最高的组织。其他身体部位,甚至血液中也发现了可检测到的朊粒[104]。vCJD患者在网状内皮组织中有传染性,尽管低于中枢神经系统[105]。目前的WHO指南是1999年发布,推荐使用常规处置措施来处理CSF以外的血液和体液[106]。WHO指南推荐不要在自动化仪器上检测受朊粒污染的脑脊液,但这一指南很难实际执行,因为通常脑脊液在临床实验室检测几天、几周或几个月后才能诊断出CJD。

朊病的几个感染控制指南可以在如下网址找到。

- 英国(https://www.gov.uk/government/publications/guidance-from-the-acdp-tse-risk-management-subgroup-formerly-tse-working-group)
- WHO(http://www.who.int/csr/resources/publications/bse/WHO_CDS_CSR_APH_2000_3/en/)
- 美国CDC第五版微生物学和生物医学实验室的生物安全,Ⅷ篇,H章(https://www.cdc.gov/biosafety/publications/bmbl5/BMBL5_sect_VIII_h.pdf)

一般来说,如果要消毒的材料可以承受严酷

的处置，那么对可能有朊粒污染的材料的消毒规则是，浸泡待消毒的材料或受污染的表面，于 1N 氢氧化钠（或 20 000 ppm 的次氯酸钠）1 h，之后中和化学消毒剂，然后继续进行常规消毒程序[107]。

美国 CDC 推荐，处理人体组织中朊粒的实验室应采用二级生物安全（BSL-2）实验室规范[100]。虽然 CJD 患者身上多部位都会发现朊粒，但与其他组织、血液或脑脊液相比，CNS 组织通常含有的朊粒滴度要高得多。美国 CDC 推荐，尸检过程中对含有朊粒的中枢神经系统组织尸检标本，应"在 BSL-2 设施中以 BSL-3 的实践方式进行极其小心的处理"。美国 CDC 赞助的国家朊病病理监测中心具有进行 CJD 尸检的专业知识，可以提供咨询。对 CAP 认证的实验室，其 CAP 解剖病理学检查列表明确描述了怀疑含有朊粒的组织学标本的特殊处理方法[101]。

六、鉴定

目前诊断和分类朊病、确定疾病起源的金标准是尸检[49]，而生前（antemortem）的检查仍有诊断价值，且通常在死亡前就能对 CJD 做出可靠的诊断。临床表现（见临床意义部分）、家族史、脑组织检查、脑脊液分析、基因检测、脑磁共振成像（MRI）和脑电图均有助于朊病的诊断[49,95,108]。

（一）朊粒的分类

人类朊病具有表型异质性[29-31,49]，而临终前（premortem）的临床诊断特异性较差。尽管改进的脑脊液实验室检测方法和脑 MRI 检查有助于提高临床诊断的可靠性，但对脑组织标本的检查仍然是确定疾病起源的金标准。2 个朊病表型和起源的主要决定因素是致病朊蛋白的构象结构（PrP^{Sc}），蛋白质水解后在免疫印迹上生成高（1 型）或低（2 型）分子量片段（图 112-1），和 *PRNP*129 密码子蛋氨酸（M）或缬氨酸（V）的多态性。结合神经病理特点，这些因素现在用于对散发的人类朊病进行分类，并被世界各地的朊病监测中心采用[30,49,95]。这个分类方案描述了 6 种 sCJD 亚型：MM1、MV1、VV1、MM2、MV2 和 VV2[108-109]。sCJD 亚型 MM1 和 MV1 通常认为是一个单一的亚型，因为其表型相似。半数以上的 sCJD 病例可以归类为 MM1 亚型，但 1/5 为混合型[108-110]。值得注意的是，这些亚型与尸检中独特的大脑组织病理学发现密切相关，以至于神经病理学发现常常可以预测朊粒亚型[111]。不同的朊粒亚型与不同的临床病程相关[94]，并代表不同的朊株（prion strain）——具有明显不同的朊颗粒（prion particle）构象结构[29,31-33,112]。（译者注：这一段有 premortem，上一段有 antemortem。查《多兰医学辞典》第 29 版，antemortem 解释为 before death；没有 premortem，对 premortal 解释为 occurring just before death。看来 Premortem 比 antemortem 离死亡更近一些。）

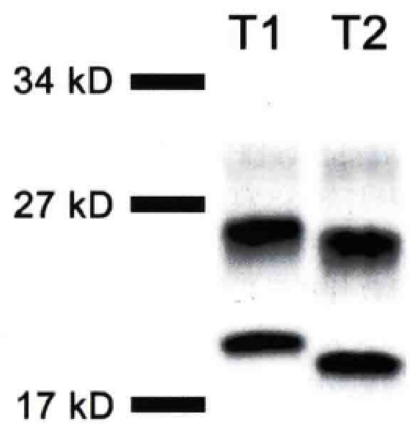


图 112-1 展示了蛋白酶 K 处理过的脑组织标本的免疫印迹（Western Blot）。因为可以抵抗蛋白酶降解，所以可见 PrP^{Sc} 条带。带有 1 型朊粒的样本位于 T1 泳道，带有 2 型朊粒的样本位于 T2 泳道。每个泳道可见 3 条带，最低分子量带［T1 泳道约 21 kDa，T2 泳道为 19～20 kDa］代表未糖基化的 PrP^{Sc}，近 26 kDa 的带代表单糖基化的 PrP^{Sc}，在 29 kDa 附近的弱带代表双糖基化的 PrP^{Sc}

（二）免疫印迹

典型情况下 PrP^{Sc} 可以抵抗蛋白酶 K。脑组织可以用蛋白酶 K 处理，它消化 PrP^{Sc} 以外的蛋白质。蛋白酶 K 处理后残留的 PrP^{Sc} 可通过电泳迁移模式进行检测和分类[93,108-110]。免疫印迹结果显示，PrP^{Sc} 具有三条带，分别为未糖基化带、单糖基化带和双糖基化带。分子量为 20～21 kDa 的未糖基化 PrP^{Sc} 为 1 型，分子量为 19 kDa 的未糖化 PrP^{Sc} 为 2 型（图 112-1）[108]。值得注意的是，VPSPR 中 PrP^{Sc} 可以被蛋白酶 K 消化[39,78]。

(三)组织病理学

通过活检或尸检获得的脑组织可用于组织学检查(图 112-2)。CJD 患者大脑的典型组织学表现包括海绵状变性、神经元丢失和星形胶质细胞增生[95]。特异性的神经病理学发现可用于预测朊粒亚型[111]。关键性的组织学发现可以指导诊断。PrP 免疫组化染色可以用于判断疾病的特征，例如，PrP^{Sc} 在皮质层的斑块沉积是 vCJD 的一个关键特征。其他的组织学特征和这些特征在大脑中的位置可以用来提示 6 种 sCJD 亚型中的一种[94,110-111]。PrP^{Sc} 在 vCJD 患者的淋巴组织(lymphoid tonsils)中有可靠的识别，但在 sCJD 患者中不存在[113]。

(四)磁共振成像

弥散加权 MRI 在识别朊病方面的敏感性约为 90%，一个关键的征象是灰质内的限制性扩散(图 112-3)，这与海绵状改变有关[114]。使用液体衰减反转恢复或 T2 成像的高强度与朊病中的星形细胞增多症有关。通常累及的区域包括皮质、基底神经节、纹状体(尾状体和壳核)和丘脑(包括肺动脉)。正电子发射断层扫描或单光子发射计算机断层扫描对朊病的诊断有一定价值，但 MRI 仍是可疑 CJD 的主要影像学评价指标[115-116]。有些放射学发现可以提示朊病的某些类型(如 sCJD、vCJD、gCJD)或亚型(如 MM1、MV2 等)[114,116]。

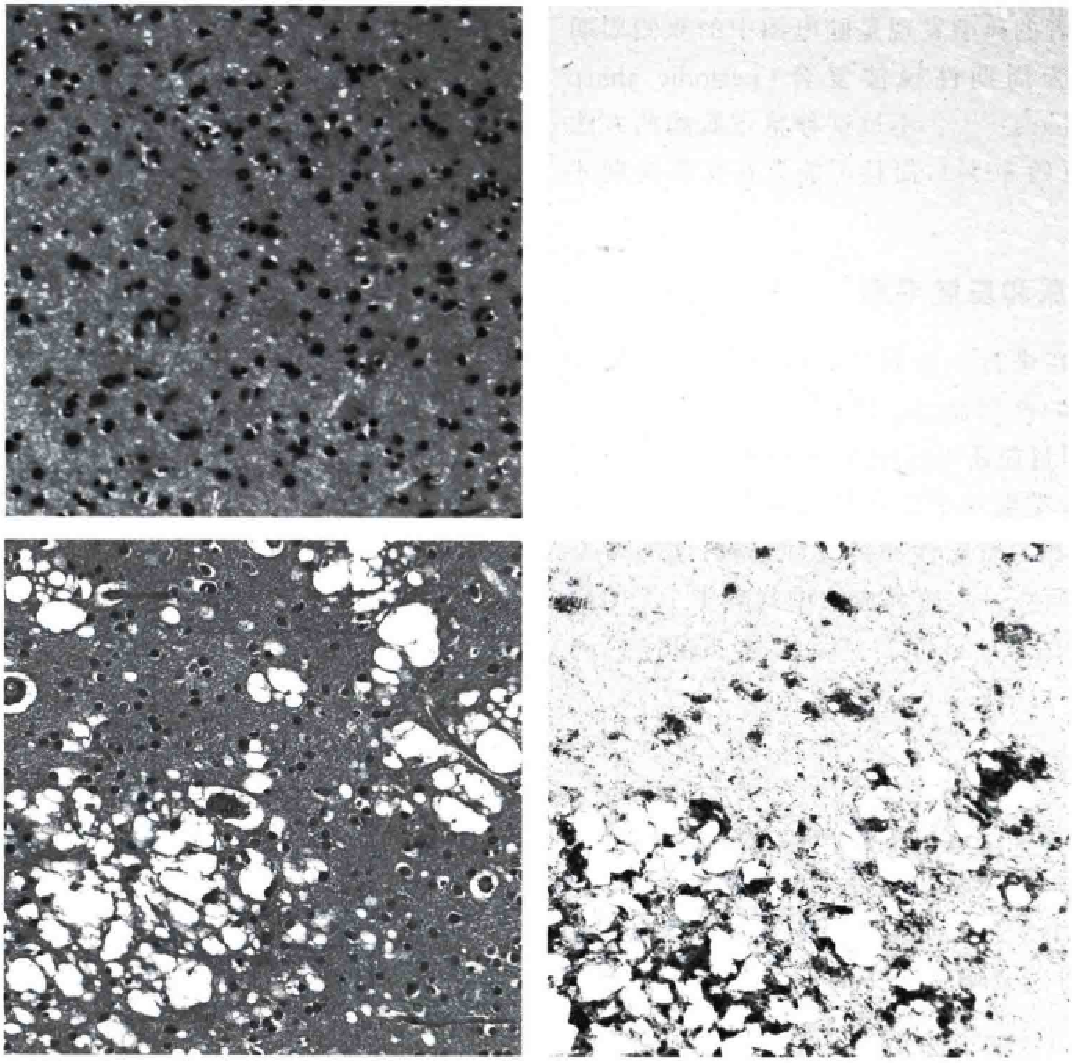


图 112-2 描述了人脑枕部皮质组织切片的显微照片。上面是正常组织，下面是 sCJD 中的发现。左面是苏木素伊红染色，左下图出现了粗的融合空泡(海绵状改变)，这是朊病的诊断特征。右图的组织切片已经用蛋白酶处理，该酶降解正常的细胞朊蛋白。蛋白酶处理后，对组织进行免疫组化染色，以检测任何抵抗蛋白酶处理的朊蛋白。这些剩余的朊蛋白沉积证实即棕色聚集体，该发现是朊病的诊断特征，见彩插

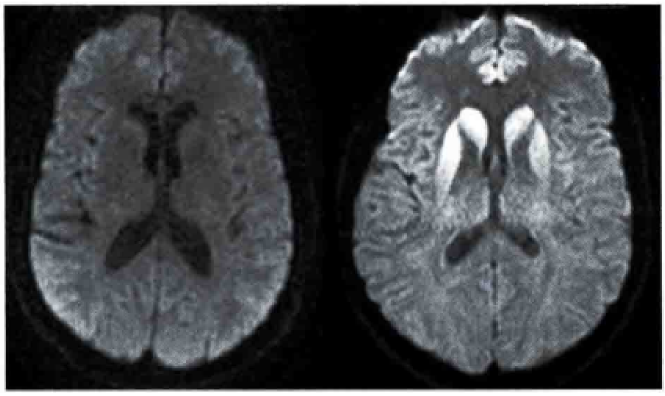


图 112-3 脑部的弥散加权 MRI 成像。左侧没有朊病，右侧基底节有和朊病相关的高强度成像

(五)脑电图

朊病患者的典型发现是脑电图中的双侧周期性放电，称为周期性锐波复合(periodic sharp wave complexes)[114]。不过这种鉴定朊病的方法敏感性较低(约 50%)，而且可能只在病程晚期才明显[114]。

(六)血液、尿和鼻腔毛刷

目前正在进行一项研究，试图检测可能患有朊病的个体的外周血、尿、鼻腔毛刷、皮肤和内脏中的朊粒，但目前还不能用于临床[117-120]。研究表明，这些标本类型对于临床检测或血液制品筛选可能具有足够的敏感性和特异性，但目前通常是单一中心的研究。从尿和血液中检测 PrP^{Sc} 的研究主要集中在 vCJD[117,120]，因此尚未确定检测 sCJD 的潜在适用性。

(七)脑脊液

多个诊断试验适用于脑脊液，有助于诊断或排除朊病。典型情况是两种类型的检测：第一种检查脑脊液中是否有神经退行性变的非特异性标志物；第二种检查脑脊液中的 PrP^{Sc}，它是疾病的致病因子。

多种试验可用于鉴定脑脊液中的脑组织分解产物，包括 14-3-3、tau、神经元特异性烯醇化酶和 α 突触核蛋白(α-synuclein)。14-3-3 分析是用于检测朊病的经典试验，虽然已经有其他更敏感和特异的分析方法，但仍然会经常使用它[121]。Western blot 或酶联免疫吸附试验均可用于鉴定 14-3-3 升高。另一个重要的非特异性标志物是总的 tau，通常通过酶联免疫吸附试验鉴定[49,122]。由于朊病导致脑组织迅速恶化，这些标志物对检测朊病非常敏感。然而，许多其他的疾病诊断也可能导致水平升高，所以这些标志物缺乏特异性。较缓慢进展的朊病，如某些遗传性朊病，其神经退行性变的标志物水平可能低于进展较快的朊病。

实时震动诱导转换(real-time quaking-induced conversion，RT-QuIC)是近年开发的检测 PrP^{Sc} 的新方法[123-124]。该检测没有识别疾病的替代标志物，但是它检测到朊粒的复制(接种)活性。该试验使用重组 PrP^{C} 为试剂底物，并用疑似患有朊病的患者的 CSF 进行试验。如果脑脊液中存在 PrP^{Sc}，PrP^{Sc} 模板会在体外诱导 PrP^{C} 底物的错误折叠。这些错误折叠的蛋白质通过报告试剂硫黄素 T 的相对荧光增强来检测(图 112-4)。第二代 CSFRT-QuIC 检测人朊病的敏感性为 92%~95%，特异性为 98.5%[125]。

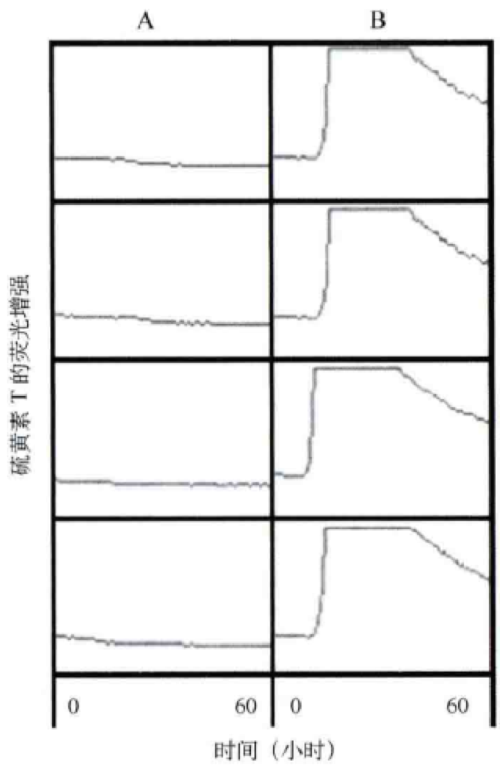


图 112-4 图示 2 例患者脑脊液标本的 RT-QuIC 曲线[125]。样本 A 显示 RT-QuIC 结果为阴性，荧光在基线以上没有增加。样本 B 显示阳性的 RT-QuIC 结果，相对荧光信号急剧增加，后逐渐降解

(八) *PRNP* 基因检测

与任何基因检测一样，在对活着的个体进行检测之前，应该咨询遗传学顾问（genetic counselor）。*PRNP* 序列分析可以用来确定密码子 129 的基因型，并确定基因是否有可能导致遗传性朊病的突变[13,57]。基因检测可以使用有生命个体的外周血，或尸检组织。与 gCJD 相关的最常见突变是 E200K，但也报道了许多其他 *PRNP* 突变[57,96,126]。

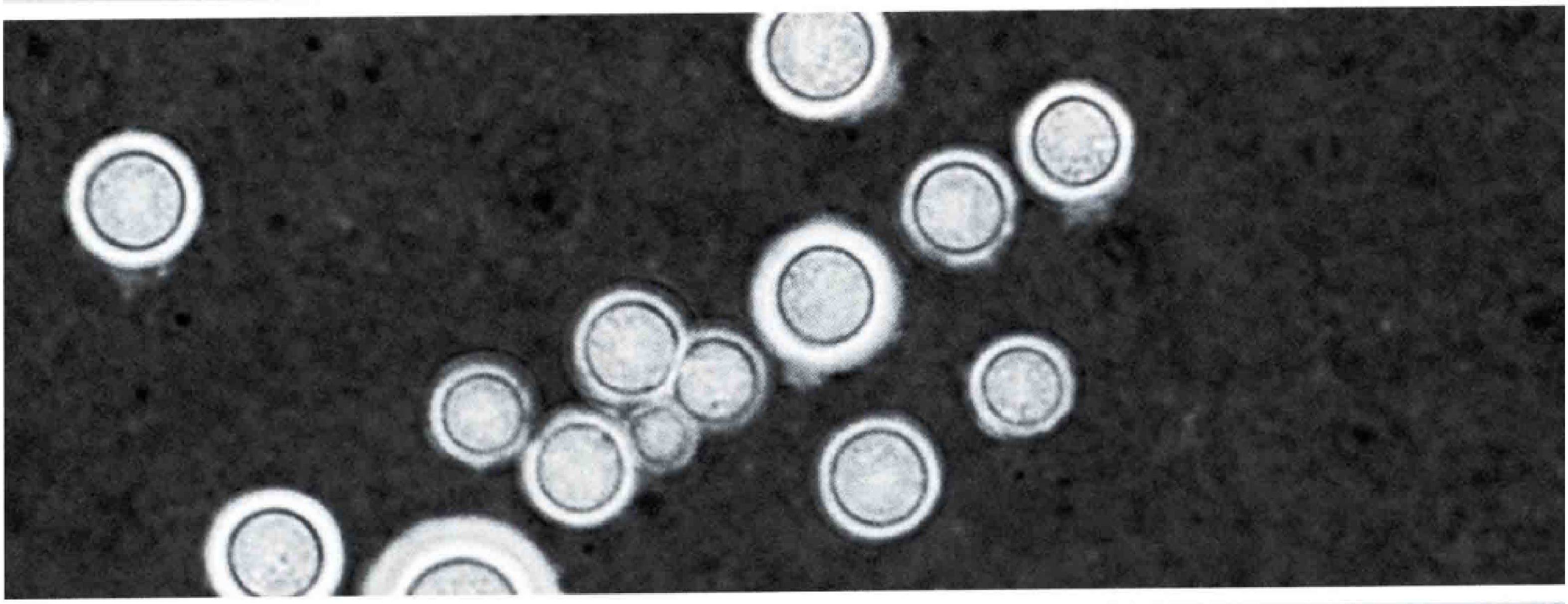
七、结果的评价、解释和报告

理想情况下，当医嘱者考虑朊病的可能性时，应通知实验室相关信息。在接受脑脊液或 CNS 组织标本进行检测之前，应该告知实验室这方面的考虑，以便采取适当的实验室预防措施和随后的消毒措施。对疑似患有朊病的患者的脑脊液或 CNS 组织的实验室评估，应遵循其处理、检测和消毒的机构内政策和程序（见消毒部分）。朊病的诊断或排除应基于全部临床信息，包括临床和家族史、症状学、神经系统体征、影像学表现和实验室结果。MRI 和脑脊液检测在评估有生命患者朊病的可能性方面起着特别重要的作用（见鉴定部分）。尸检仍是金标准，可以明确朊病的诊断，确定朊病特征。尸检在调查每个个体朊病的病因和流行病学中起着至关重要的作用。

参考文献请扫二维码查阅

第五部分　抗病毒药物和敏感性试验方法

第14篇



第五部分　抗病毒药物和敏感性试验方法

第14篇

抗病毒药物和敏感性试验

第113章 抗病毒药物*

CARLOS A. Q. SANTOS, NELL S. LURAIN

（张蕴莉 译；戴二黑、芮勇宇 审校）

抗病毒药物越来越广泛地用于病毒性疾病的治疗。目前，美国 FDA 批准的大多数药物可有效对抗以下一种或几种病毒：人类免疫缺陷病毒 1 型和 2 型（HIV-1 和 HIV-2）；乙型和丙型肝炎病毒（HBV 和 HCV）；人类疱疹病毒；甲型和乙型流感病毒。本章节按照这些病毒的组别及与之对应的具有抗多组病毒活性的药物进行组织，这些药物主要针对病毒的复制酶、蛋白酶及进入/释放通路[1-4]。少数情况下，用于以上病毒科的审批药物也被用于治疗其他科的病毒。广谱药物的使用将在个体化药物部分讨论。

一、抗 HIV-1 和 HIV-2 药物

目前有 5 类治疗 HIV-1 的抗病毒药物：①核苷/核苷酸逆转录酶抑制剂（nucleoside/nucleotide reverse transcriptase inhibitors, NRTIs/NtRTIs）；②非核苷逆转录酶抑制剂（nonnucleoside reverse transcriptase inhibitors, NNRTIs）；③蛋白酶抑制剂（protease inhibitors, PIs）；④穿入/融合抑制剂；⑤整合酶链转移抑制剂（integrase strand transfer inhibitors, INSTIs）。每类药物的最新信息可通过艾滋病信息网站（http://AIDSinfo.nih.gov）查询，已经审批的抗逆转录病毒药物对不同人群都有各自的使用指南：青少年和成人、儿科患者、感染 HIV-1 的孕妇[5-7]。这些指南描述了药物的剂量、不良反应和药物之间的相互作用。每类人群的工作组会对指南定期更新。更多信息可从制药公司网站的药品说明书获得。由于推荐的药物剂量及其观察到的不良反应和药物相互作用经常发生改变，因此很有必要查阅最新信息。

抗逆转录病毒药物需与不同种类的药物联合使用，即联合抗逆转录病毒疗法（combined antiretroviral therapy, cART）以最大限度地提高疗效并尽量减少耐药性的产生。现在普遍认为 cART 是旨在实现病毒完全抑制目标的任何组合方案。这些方案至少包含 3 种药物，即通常以非核苷类逆转录酶抑制剂为基础（2 种核苷/核苷酸逆转录酶抑制剂加一种非核苷类逆转录酶抑制剂）、以蛋白酶抑制剂为基础（2 种核苷/核苷酸逆转录酶抑制剂加一种或几种蛋白酶抑制剂）或最近的以整合酶链转移抑制剂为基础（2 种核苷/核苷酸逆转录酶抑制剂加一种整合酶链转移抑制剂）[5]。

目前获批的 25 种抗逆转录病毒药物[1]有多种不同组合的治疗方案。指南中有针对初治和曾接受过治疗的成人和青少年的推荐方案[5]。如此数量众多的药物产生了巨大的不同种类抗病毒药物之间，以及抗病毒药物与视 HIV 感染情况而开具的其他种类药物之间的相互作用。因此，需要密切观察这些复杂的相互作用，以避免药物水平和（或）毒性的有害变化。

表 113-1 总结了美国 FDA 审批的单一药物和联合药物的结构、作用机制和主要的不良反应。下面描述的每种药物的相互作用只突出强调了潜在的相互作用。及时更新的和更全面的信息可从 AIDSinfo 网站上获得。

---

*本章包含 Aimee C. Hodowanec、Kenneth D. Thompson 和 Nell S. Lurain 在本手册第 11 版第 110 章中所呈现的部分内容

表 113-1 治疗人类免疫缺陷病毒(HIV)的抗病毒药物[a]

抗病毒药物(缩写)	商标名(制药公司[b])	作用机制/给药途径	主要的不良反应
核苷或核苷酸逆转录酶抑制剂(NRTI-NtRTIs)			
阿巴卡韦(ABC)	Ziagen(GSK)	由细胞激酶转变为 dGTP 的三磷酸类似物,逆转录酶(RT)的竞争性抑制剂,病毒 DNA 链终止子;口服	与 HLA-B*570 相关的超敏反应
去羟肌苷(ddI)	Videx(BMS)	由细胞激酶转变为 dATP 的双脱氧三磷酸类似物;活性和给药方式与阿巴卡韦相似	胰腺炎、周围神经病变、恶心、腹泻
恩曲他滨(FTC)	Emtriva (Gilead)	由细胞激酶转变为 dCTP 的三磷酸类似物;活性和给药方式与阿巴卡韦相似	低毒性、皮肤色素沉着、乙肝合并感染治疗后加重
拉米夫定(3TC)	Epivir(GSK)	由细胞激酶转变为 dCTP 的三磷酸类似物;活性和给药方式与阿巴卡韦类似	低毒性,乙肝合并感染治疗后加重
司他夫定(d4T)	Zerit(BMS)	由细胞激酶转变为 dTTP 的三磷酸类似物;活性和给药方式与阿巴卡韦类似	周围神经病变,脂代谢障碍,动作迟缓
丙酚替诺福韦(TAF)	Vemlidy (Gilead)	转化为替诺福韦需经过二酯水解,单磷酸酯类似物由细胞激酶双磷酸化	乏力,头痛,胃肠道症状,咳嗽,乙肝合并感染治疗后加重
富马酸替诺福韦酯(TDF)	Viread(Gilead)	活性和给药方式与阿巴卡韦相似,与 TAF 一样	乏力、头痛、胃肠道症状、咳嗽、骨密度降低、脂代谢障碍;乙肝合并感染治疗后恶化
齐多夫定(AZT 或 ZDV)	R 依曲韦林 ovir (GSK)	由细胞激酶转变为 dTTP 的三磷酸类似物,活性和给药方式与阿巴卡韦相似	骨髓抑制、胃肠道症状、头痛、失眠
核苷或核苷酸逆转录酶抑制剂(NRTI-NtRTI)复方药剂			
阿巴卡韦(ABC)+拉米夫定(3TC)	Epzicom(GSK)	见以上单独 NRTIs	见以上单独 NRTIs
阿巴卡韦(ABC)+齐多夫定(AZT)+拉米夫定(3TC)	Trizivirr(GSK)	见以上单独 NRTIs	见以上单独 NRTIs
恩曲他滨(FTC)+替诺福韦(TDF)+依非韦伦(EFV)	Atripla (Gilead and BMS)	见以上单独 NTRIs-NtRTIs	见以上单独 NTRIs-NtRTIs
替诺福韦(TDF)+恩曲他滨(FTC)	Truvada (Gilead)	见以上单独 NTRIs-NtRTIs	见以上单独 NTRIs-NtRTIs
非核苷逆转录酶抑制剂(NNRTIs)			
依非韦伦(EFV)	Sustiva(BMS)	结合到 HIV-1 逆转录酶附近催化位点的非竞争性抑制剂,干扰正常聚合功能;口服	皮疹(史蒂文斯-约翰逊综合征)、精神症状、中枢神经系统症状(例如头晕、失眠、意识模糊)、转氨酶升高、致畸性
依曲韦林(ETR)	Intelence (Tibotec)	活性和给药方式类似于依非韦伦	皮疹(史蒂文斯-约翰逊综合征)、胃肠道症状
奈韦拉平(NVP)	Viramune(BI)	活性和给药方式类似于依非韦伦	严重的肝毒性、皮疹(史蒂文斯-约翰逊综合征)
利匹韦林(RPV)	Edurant (Tibotec)	活性和给药方式类似于依非韦伦	皮疹、抑郁、头痛、失眠、肝毒性
蛋白酶抑制剂			
阿扎那韦(ATV)	Reyataz(BMS)	肽类蛋白酶,竞争性结合到 HIV 蛋白酶活性位点,阻止病毒多聚蛋白前体剪切,产生未成熟、无感染力的病毒颗粒;口服	高间接胆红素血症、PR 间期延长、高血糖症、脂肪重新分布、血友病出血概率增加、肾结石

（续 表）

抗病毒药物(缩写)	商标名(制药公司[b])	作用机制/给药途径	主要的不良反应
达芦那韦(DRV)	Prezista (Tibotec)	非肽类蛋白酶，抑制蛋白酶二聚化，阻止病毒多聚蛋白剪切，口服	皮疹(史蒂文斯-约翰逊综合征)、肝毒性、高血糖症、脂肪重新分布、胃肠道症状、转氨酶升高、血友病出血概率增加、肾结石
福沙那韦(FPV)	Lexiva(GSK)	由细胞磷酸酶转变为安瑞那韦；活性和给药方式与阿扎那韦类似	皮疹、胃肠道症状、头痛、高脂血症、脂肪重新分布、转氨酶升高、高血糖症、血友病出血概率增加
茚地那韦(IDV)	Crixivan (Merck)	活性和给药方式与阿扎那韦类似	肾结石/尿结石、胃肠道症状、高间接胆红素血症、高脂血症、溶血性贫血、头痛、高血糖症、脂肪重新分布、血友病出血概率增加
洛匹那韦(LPV)＋利托那韦(RTV)	Kaletra (Abbott)	活性和给药方式与阿扎那韦类似	胃肠症状、乏力、高脂血症、转氨酶升高、高血糖症、脂肪重新分布、转氨酶升高、血友病出血概率增加
奈非那韦(NFV)	Viracept(Pfizer)	活性和给药方式与阿扎那韦类似	腹泻、高脂血症、高血糖症、脂肪重新分布、转氨酶升高、血友病出血概率增加
利托那韦(RTV)	Norvir(Abbott)	活性和给药方式与阿扎那韦类似	严重的胃肠道症状、口周感觉异常、高脂血症、肝炎、乏力、味觉障碍、高血糖症、脂肪重新分布、血友病出血概率增加
沙奎那韦(SQV)	Invirase(Roche)	活性和给药方式与阿扎那韦类似	胃肠道症状、高脂血症、转氨酶升高、头痛、高血糖症、脂肪重新分布、血友病出血概率增加
替拉那韦(TPV)	Aptivus(BI)	非肽类蛋白酶；活性和给药方式与地瑞拉韦类似	肝毒性、高血糖症、磺胺过敏、皮疹、高脂血症、脂肪重新分布、血友病出血概率增加、罕见的颅内出血
进入抑制剂			
恩夫韦肽(T20)	Fuzeon(Roche)	结合于 gp41 亚基的七残基重复序列的开端，阻止病毒包膜与细胞膜融合所必需的构象变化；注射给药	注射部位反应、肺炎、超敏反应
马拉韦罗(MVC)	Selzentry (Pfizer)	CCR5 辅助受体拮抗剂；变构结合到 CCR5 使其构象改变，阻止 gp120 结合；口服	上呼吸道感染、咳嗽、发热、皮疹、头晕
整合酶链转移抑制剂			
多替拉韦(DTG)	Tivicay (Viiv/GSK)	阻止未整合的 HIV DNA 与宿主 DNA 之间形成共价键，阻止原病毒形成；口服	头痛、失眠、疲劳、谷草/谷丙转氨酶升高、肌酸激酶升高
埃替拉韦(EVG)＋考比司他(COBI)＋替诺福韦＋恩曲他滨	Stribild(Gilead)	埃替拉韦：阻止未整合的 HIV DNA 与宿主 DNA 之间形成共价键，阻止原病毒形成；需要药物增强；口服 考比司他：药代动力学增强剂；抑制 CYP3A4 替诺福韦和恩曲他滨：见以上的蛋白酶抑制剂	复方 EG-考比司他-TDF-恩曲他滨：胃肠道反应、肾损害、骨质疏松
拉替拉韦(RAL)	Isentress (Merck)	阻止未整合的 HIV DNA 与宿主 DNA 之间形成共价键，阻止原病毒形成；口服	头痛、胃肠道症状、乏力、疲劳、发热、肌酸磷酸激酶升高

注：[a] 注意，所有 NRTI/NtRTI 均有乳酸酸中毒和严重肝肿大伴脂肪变性的不良反应。[b] 制药公司：雅培(Abbott)公司，芝加哥北部，伊利诺伊州；BI. 勃林格殷格翰(Boehringer Ingelheim)药业，里奇菲尔德，犹他州；BMS. 百时美施贵宝(Bristol-Meyers Squibb)，普林斯顿，新泽西州；吉利德(Gilead)科学公司，福斯特市，加利福尼亚州；GSK. 葛兰素史克(GlaxoSmithKline)，研究三角公园，北卡罗来纳州；默克(Merck)公司，白宫站，新泽西州；辉瑞(Pfizer)，纽约，纽约州；罗氏(Roche)制药，纳特利，新泽西州；奥多(Ortho)生物技术公司蒂博特克(Tibotec)治疗分部，拉里坦，新泽西州

(一)核苷/核苷酸逆转录酶抑制剂

核苷/核苷酸逆转录酶抑制剂类药物必须经细胞激酶磷酸化形成三磷酸核苷衍生物才能发挥作用,该衍生物缺少 DNA 链延伸的 3′端羟基基团。核苷逆转录酶抑制剂需要三磷酸化,而核苷酸逆转录酶抑制剂只需双磷酸化[1]。这类抗病毒药物作为病毒逆转录酶的竞争性抑制剂,从而导致链的终止。它们具有抗 HIV-1 和 HIV-2 的活性,并且在与非核苷类逆转录酶抑制剂、蛋白酶抑制剂和整合酶链转移抑制剂等双重联合的方案中被用作主要成分[5]。由于 HBV DNA 聚合酶具有逆转录酶的活性,这类药物中的几种也具有抗 HBV DNA 聚合酶的作用(见以下的"抗乙型肝炎病毒的药物")[3]。乳酸性酸中毒合并肝脂肪变性是由所有这类药物引起的一种罕见但很严重的不良反应。核苷逆转录酶抑制剂和核苷酸逆转录酶抑制剂的毒性作用似乎是因为抑制了线粒体 DNA 聚合酶 γ 所致[8]。

1. 阿巴卡韦

(1)药理学:阿巴卡韦(abacavir,ABC)的口服生物利用度为 83%。其血浆半衰期为 1.5 h,胞内半衰期为 12~26 h。阿巴卡韦可随餐或空腹服用。经乙醇脱氢酶和葡萄糖醛酸基转移酶代谢后,82% 的代谢产物经肾排出。动物实验证实可通过胎盘[7]。通过中枢神经系统渗透吸收的阿巴卡韦足以抑制 HIV 的复制[9]。建议将阿巴卡韦与 dolutegravir(DTG)和拉米夫定(3TC)联合治疗。指南建议在给心血管疾病高危患者开阿巴卡韦处方时应谨慎,几项研究表明阿巴卡韦与心血管疾病的风险增加有关,但也有研究数据并未显示出相关性[10-12]。对于 HLA-B * 5701 主要组织相容性复合物Ⅰ类(MHC-Ⅰ)等位基因阳性的患者,阿巴卡韦被禁止用作备选药物,因为与对该药物的超敏反应有关[5,13]。包含阿巴卡韦在内的由 2~3 种核苷/核苷酸逆转录酶抑制剂组成的复方制剂已有市售(表 113-1)。

(2)药物相互作用:阿巴卡韦降低美沙酮的水平。乙醇通过共同的代谢途径增加血浆中阿巴卡韦的浓度[5]。

2. 去羟肌苷

(1)药理学:去羟肌苷(didanosine,ddI)口服生物利用度为 30%~40%,血浆半衰期为 1.5 h,胞内半衰期大于 20 h。空腹服用。一半药物经过肾脏排出。该药中枢神经系统渗透率较低,但据报道可以通过人类胎盘[7]。对初治患者不再推荐使用去羟肌苷[7]。

(2)药物相互作用:去羟肌苷与司他夫定(d4T)或富马酸替诺福韦(TDF)合用会增加每种药物相关的毒性发生率和严重程度。更昔洛韦(GCV)、缬更昔洛韦(val-GCV)、利巴韦林(RBV)和别嘌醇也会增加去羟肌苷的暴露剂量,从而增加去羟肌苷的毒性[5,14-15]。

3. 恩曲他滨

(1)药理学:恩曲他滨(emtricitabine,FTC)的口服生物利用度为 93%。血浆半衰期为 10 h,胞内半衰期大于 20 h。恩曲他滨可随餐或空腹服用,大部分(86%)以原型形式经肾排出,剩余部分由粪便排泄。它具有中等中枢神经系统细胞渗透率[16],并已证明可穿过胎盘[7]。恩曲他滨作为推荐的首选药物与替诺福韦(TDF)合用可用于以非核苷类逆转录酶抑制剂、蛋白酶抑制剂或整合酶链抑制剂为基础方案的初治患者。不建议与拉米夫定(3TC)合用,因为这 2 种药有相似的耐药模式却没有联合用药的治疗优势[5]。

(2)药物相互作用:尚未见与其他抗逆转录病毒药物间有明显的相互作用[5,17]。

4. 拉米夫定

(1)药理学:拉米夫定(lamivudine,3TC)口服生物利用度为 86%。血浆半衰期为 5~7 h,胞内半衰期为 18~22 h。

该药可随餐或空腹服用,71% 经由肾排泄。拉米夫定可通过人类胎盘[7]并具有中等中枢神经系统[16]穿透力。推荐拉米夫定替代双-核苷逆转酶抑制剂方案中的阿巴卡韦,并联合非核苷逆转录酶抑制剂、蛋白酶抑制剂或整合酶链转移抑制剂用于初治患者[5]。不推荐拉米夫定和恩曲他滨合用(见上述"恩曲他滨")。

(2)药物相互作用:拉米夫定由肾的有机阳离子转运系统主动排出;因此,应考虑与其他使用相同通路的药物之间的相互作用,例如复方新诺明[5]。

5. 司他夫定

(1)药理学:司他夫定(stavudine,d4T)的口服生物利用度为 86%。血浆半衰期为 1 h,胞内半衰期为 7.5 h。司他夫定可随餐或空腹服用,50%

由肾排出。司他夫定可通过动物胎盘，并具有中等的中枢神经系统渗透率[7,18]。由于具有毒性，不再推荐司他夫定用于初治患者[5]。在一线儿科治疗方案中已为阿巴卡韦或齐多夫定（ZDV）所取代[19]。

（2）药物相互作用：司他夫定与去羟肌苷合用会增加每种药物相关毒性的发生率和严重程度。齐多夫定和利巴韦林能够抑制司他夫定的磷酸化[20-21]。

6. 富马酸替诺福韦和丙酚替诺福韦

（1）药理学：虽然富马酸替诺福韦（tenofovir disoproxil fumarate，TDF）服用时不需注意饮食，但是空腹口服生物利用度仅为 25%，而高脂饮食为 39%。其血浆半衰期为 17 h，胞内半衰期＞60 h。该药大部分（70%～80%）以原型形式经肾排出。动物实验表明富马酸替诺福韦可通过胎盘，但它的中枢神经系统渗透性较低[7,16]。它不像其他的核苷逆转录酶抑制剂和核苷酸逆转录酶抑制剂那样具有线粒体毒性，然而，有使用富马酸替诺福韦合并肾功能不全和骨质疏松的报道。推荐富马酸替诺福韦和恩曲他滨[含 elvitegravir（EVG）和 cobicistat（COBI）][5,22]合用作为核苷逆转录病毒抑制剂-核苷酸逆转录病毒抑制剂的双重主要成分。

丙酚替诺福韦（tenofovir alafenamide，TAF）是目前在临床试验的替诺福韦的前体药物，作为抗逆转录病毒药与富马酸替诺福韦一样有效，但使用剂量低得多[23]。因此，与富马酸替诺福韦相比，丙酚替诺福韦与骨质疏松和肾毒性相关[22]。丙酚替诺福韦已获批准以埃替拉韦-考比司他-恩曲他滨或达芦那韦-利托那韦（RTV）/恩曲他滨的组合制剂形式用于初始抗逆转录病毒治疗[5]。

（2）药物相互作用：富马酸替诺福韦能增加血浆中去羟肌苷的浓度，从而增强毒性[14]。与更昔洛韦、缬更昔洛韦、阿昔洛韦（ACV）或西多福韦（CDV）合用有可能增强其毒性[5]。

丙酚替诺福韦是 P-糖蛋白的底物。通过这种途径降低丙酚替诺福韦的药物包括抗惊厥药、抗分枝杆菌药和圣约翰草[5]。

7. 齐多夫定

（1）药理学：齐多夫定（zidovudine，ZDV）的口服生物利用度为 60%，血浆半衰期为 1.1 h，细胞内半衰期为 7 h。齐多夫定服用时不需注意饮食。该药被代谢成葡萄糖醛酸的形式经肾排出。

齐多夫定可通过血-脑脊液屏障在中枢神经系统中形成有效浓度[16]并且可以通过胎盘。齐多夫定和拉米夫定是针对孕妇的联合治疗方案中首选的双重核苷逆转录病毒抑制剂主要成分[7]。如果孕妇 HIV 病毒载量≥400 拷贝/ml 或者产期临近而病毒载量未知，那么在分娩时可以静脉注射齐多夫定以阻断母婴传播。不再推荐经联合抗病毒疗法病毒已得到控制的 HIV 感染的母亲在分娩期使用齐多夫定。婴儿可单独口服齐多夫定或与奈韦拉平（NVP）和（或）3TC 联合用药[7,24]。对于成人和青少年，齐多夫定联合拉米夫定可以作为双重逆转录酶抑制剂联合非核苷逆转录酶抑制剂为基础和蛋白酶抑制剂为基础的治疗方案中的 2 种主要成分。然而，因为该方案需要每天 2 次的剂量而且毒性比富马酸替诺福韦/恩曲他滨或者阿巴卡韦/拉米夫定更高，故不再作为首选或替代方案[5]。

（2）药物相互作用：齐多夫定可通过胸苷激酶抑制司他夫定的磷酸化[24]。利巴韦林可抑制齐多夫定的磷酸化[21]。更昔洛韦和 α-干扰素可能增加齐多夫定的血液毒性[25-26]。

8. 核苷/核苷酸逆转录酶抑制剂复方制剂

有多种包含核苷/核苷酸逆转录酶抑制剂的固定剂量复合剂，为方便使用，已有以下商品化配方上市：阿巴卡韦-拉米夫定-齐多夫定（trizivir）、阿巴卡韦-拉米夫定（epzicom）、恩曲他滨-替诺福韦酯（truvada）、拉米夫定-齐多夫定（combivir）、恩曲他滨-替诺福韦酯-依非韦伦（atripla）、恩曲他滨-利匹韦林-替诺福韦酯（complera）和恩曲他滨-埃替拉韦（EVG）-考比司他（COBI）-替诺福韦酯（stribild）、恩曲他滨/利匹韦林/替诺福韦艾拉酚胺（odefsey）、恩曲他滨/替诺福韦艾拉酚胺（descovy）、埃替拉韦（EVG）/考比司他（COBI）/恩曲他滨/替诺福韦艾拉酚胺（genvoya）。临床试验显示在抑制血浆中 HIV RNA 载量低于可检测限方面，三联复方阿巴卡韦-拉米夫定-齐多夫定与以蛋白酶抑制剂为基础的治疗方案等效，但低于非核苷逆转录酶抑制剂为基础的方案[5]。因此，不再推荐阿巴卡韦-拉米夫定-齐多夫定用于初始治疗。在三联或四联药物治疗方案中一般使用 2 种核苷/核苷酸逆转录酶抑制剂作为主要成分联合一种非核苷逆转录酶抑制剂、蛋白酶抑制剂或整合

酶链转移抑制剂。三联复方剂恩曲他滨-替诺福韦酯(或丙酚替诺福韦-依非韦伦是首选初始治疗方案,而恩曲他滨-利匹韦林-替诺福韦酯和恩曲他滨-埃替拉韦-考比司他-替诺福韦酯(丙酚替诺福韦)可作为备选方案[7]。

(二)非核苷逆转录酶抑制剂

非核苷逆转录酶抑制剂类药物不需要细胞内合成代谢来发挥活性。化学结构完全不同,但它们可以非竞争结合方式结合到 HIV-1 逆转录酶催化位点附近,干扰 DNA 聚合酶活性使前 DNA 链终止。HIV-2 逆转录酶对该类药物耐药[1]。

目前有 4 种非核苷逆转录酶抑制剂:奈韦拉平、依非韦伦、依曲韦林和利匹韦林。这些药物都通过细胞色素 P450(CYP450)系统进行代谢,而蛋白酶抑制剂(见下文)和其他用于 HIV 感染情况治疗的药物也通过该系统进行代谢。共同的代谢途径可以导致严重的药物相互作用,诱导或者抑制每种药物的代谢。

非核苷逆转录酶抑制剂与 2 种核苷逆转录酶抑制剂和(或)核苷酸逆转录酶抑制剂合用通常被认为是首选的一线治疗方案,有以下原因:①较低的胃肠道症状发生率;②非核苷逆转录酶抑制剂有很长的半衰期可容许药物漏服;③可以减少蛋白酶抑制剂用量,以备将来使用。非核苷逆转录酶抑制剂的缺点:①很多该类药物的结构差异相对较小会出现交叉耐药;②与中枢神经系统相关的不良反应[7]。现在,非核苷逆转录酶抑制剂是推荐替代方案的组成部分,在首选初始方案中整合酶链转移抑制剂替代了它们。

1. 依非韦伦

(1)药理学:依非韦伦(efavirenz,EFV)的口服生物利用度为 0.1%。其血浆半衰期为 52~76 h。该药需空腹服用。99.5% 依非韦伦与血浆中的蛋白相结合,主要是白蛋白。具有中等中枢神经系统渗透率[16],依非韦伦由细胞色素 CYP3A4 和 CYP2B6 代谢,并且它是细胞色素 CYP3A4 的诱导子和抑制剂。葡萄糖醛酸化的代谢产物由尿(14%~34%)和粪便(16%~61%)排出。建议使用依非韦伦-恩曲他滨-富马酸替诺福韦酯(或替诺福韦)作为替代方案,孕妇除外,因为在猕猴妊娠 3 个月内观察到致畸作用[7]。

(2)药物相互作用:依非韦伦与以下的药物有潜在的相互作用,药物剂量可能需要改变:茚地那韦(IDV)、洛匹那韦-利托那韦(LPV-r)、福沙那韦(FPV)、奈非那韦(NFV)、沙奎那韦(SQV)、克拉霉素、利福布汀、利福平、辛伐他汀、洛伐他汀、美沙酮、伊曲康唑、抗痉挛药和口服避孕药[5]。禁忌药物是利福喷丁、西沙必利、咪达唑仑、三唑仑、麦角衍生物、圣约翰草和伏立康唑,HCV 蛋白酶抑制剂(HCV PI),在已经接受治疗的患者,阿扎那韦也是禁忌药物。

2. 依曲韦林

(1)药理学:依曲韦林(etravirine,ETR)口服生物利用度未知。血浆半衰期为(41±21)h。空腹状态下药物水平降低,因此,该药应随餐服用。99.9% 的依曲韦林在血浆中大部分与白蛋白相结合。目前不清楚依曲韦林是否能进入中枢神经系统或通过胎盘。依曲韦林由细胞色素 CYP3A4、2C9 和 2C19 进行代谢。它能诱导 CYP3A4 并能抑制 2C9 和 2C19,也是 P-糖蛋白的诱导剂[5]。依曲韦林经粪便(93.7%)和尿(1.2%)排出体外[27]。尚无依曲韦林应用于初治患者的大规模临床试验,因此暂不推荐该药用于治疗此类人群。据报道,依曲韦林可有效对抗其他非核苷逆转录酶抑制剂耐药的 HIV-1 株,包括 HIV-1O 群[28]。因此,目前该药适用于已经治疗过的但治疗失败的患者[1,27,29]。

(2)药物相互作用:以下情况需要调整剂量:洛匹那韦-利托那韦、沙奎那韦、抗心律不齐药、地塞米松、勃起障碍药物、华法林、降脂药、地西泮和抗真菌药。依曲韦林不应与以下药物合用:依非韦伦、奈韦拉平、阿扎那韦、福沙那韦、替拉那韦(TPV)、激素避孕药、圣约翰草、克拉霉素、抗分枝杆菌药物(如与利托那韦增强型蛋白酶抑制剂合用)和苯巴比妥[5,27]。

3. 奈韦拉平

(1)药理学:奈韦拉平(nevirapine,NVP)的口服生物利用度>90%,血浆半衰期为 25~30 h。60% 的奈韦拉平与蛋白结合。中枢神经系统渗透性很高,脑脊液中的药物浓度是血浆中的 45%[16]。奈韦拉平可空腹或随餐服用。该药是细胞色素 CYP3A4 和 CYP2B6 同工酶的底物,也是诱导剂[5]。葡萄糖醛酸化的代谢产物由尿(80%)和粪便(10%)排出体外。奈韦拉平可通过人类胎盘[7]。在资源有限地区,该药作为单一的口服药

物已被用作分娩期/新生儿的预防方案以阻断母婴传播[7,30]。也正在研究此药作为防止围产期传播的三药疗法的一种[7,31]。但是，NVP 与重症肝炎相关，并且耐药率低，因此，初始治疗中 NVP 不再被视为首选或替代药物。但在特殊情况下，奈韦拉平可应用于 $CD4^+$ T 细胞计数≤250 细胞/ml 的女性或 $CD4^+$ T 细胞计数≤400 细胞/ml 的男性患者，前提是这些患者肝不存在中重度肝损伤(Child-Pugh 分级为 B 或 C 级)[5]。

(2)药物相互作用：奈韦拉平可降低茚地那韦、沙奎那韦、口服避孕药、氟康唑、酮康唑、克拉霉素和美沙酮的血浆药物浓度[21]。奈韦拉平禁止与阿扎那韦、依曲韦林、利福平、利福喷汀、圣约翰草或者 HCV PI 合用[5]。

4. 利匹韦林

(1)药理学：利匹韦林(RPV)的口服生物利用度未知，其血浆半衰期为 50 h。不清楚利匹韦林是否能进入中枢神经系统或者通过胎盘。利匹韦林需要随餐服用。它是细胞色素 CYP3A4 的底物[5]。利匹韦林与替诺福韦酯-恩曲他滨或者阿巴卡韦-拉米夫定合用是初治患者的备选方案。然而，对于治疗前 HIV 病毒载量>100 000 拷贝/ml 的患者不推荐使用利匹韦林，因为它与这些患者的病毒学治疗失败有关。此外，当采用以利匹韦林为基础方案治疗 $CD4^+$ T 细胞计数<200 细胞/ml 的患者时，更可能面临病毒学治疗失败的结局[5]。利匹韦林通过 CYP3A4 代谢，并通过尿和粪便排泄。

(2)药物相互作用：禁忌的药物是抗分枝杆菌药、抗惊厥药、质子泵抑制药、HCV 蛋白酶抑制剂、地塞米松和圣约翰草[5]。

(三)蛋白酶抑制剂

蛋白酶抑制剂与非核苷逆转录酶抑制剂类似，其抗病毒活性不需要细胞内的合成代谢过程。其目标是 HIV 的编码蛋白酶，该酶用于 gag 多聚蛋白前体的转录后加工[32]。替拉那韦和达芦那韦是已报道的可以抑制蛋白酶二聚化及正常酶促活性的非肽类分子[1]。TPV 和达芦那韦是非肽类分子，据报道可抑制蛋白酶二聚化及正常酶活性[33]。蛋白酶抑制剂类药物抗 HIV-1 和 HIV-2 的相对活性千差万别，这取决于目标结合位点的氨基酸序列[34]。

蛋白酶抑制剂在 cART 方案中与核苷逆转录酶抑制剂和(或)核苷酸逆转录酶抑制剂合用普遍用于联合抗逆转录病毒治疗，以发挥最大的抗病毒活性并尽量减少耐药的产生。最初引入以蛋白酶抑制剂为基础的治疗方案时导致了治疗失败，与之相关的问题有生物利用度有限、用药频繁和毒性等。这些药物的几个特点造成了治疗上的问题。它们与血浆蛋白高度结合，主要是 α-1 酸性糖蛋白(alpha-1 acid glycoprotein，AAG)[35]。低浓度的未结合药物具有治疗活性的同时也具有毒性。蛋白酶抑制剂是 P-糖蛋白(P-gp)和多药耐药相关蛋白(MRP)的底物。P-gp 和 MRP 属于外排转运蛋白，可促进药物从细胞排出进入肠道、肝脏和肾脏，从而降低细胞内的药物浓度[36]。所有的蛋白酶抑制剂在肠道和肝脏中由细胞色素 CYP450 系统的酶代谢[37]，主要有 CYP3A、CYP2C9 和 CYP2C19。单一的蛋白酶抑制剂能诱导和(或)抑制特异的 CYP450 同工酶，从而增强或降低该药自身及其他蛋白酶抑制剂的代谢。如上所述，细胞色素 CYP450 系统同时代谢非核苷逆转录酶抑制剂及很多与 HIV 感染相关症状的治疗药物。因此，多种潜在的药物相互作用使治疗方案的选择变得很复杂，药物合用时有可能增加毒性和(或)需要调整剂量[5]。

尽管大多数蛋白酶抑制剂是 CYP3A4 的抑制剂，但利托那韦(RTV)的抑制作用最强。正因如此，利托那韦被用于强化方案中以改善第二种蛋白酶抑制剂的药代动力学特征[38]。亚治疗浓度的利托那韦通过降低第二种蛋白酶抑制剂的代谢率并提高其半衰期来增加机体的暴露剂量[37]，并降低了第二种药物的所需剂量和食物的影响。比如洛匹那韦，单独使用时生物利用度很低并且半衰期很短，但与利托那韦联合可用于初治患者以及挽救疗法[5,38-39]。利托那韦对其他蛋白酶抑制剂的药代动力学的影响各不相同，结果导致这些药物与 CYP450 系统组分的相互作用各异。下面将具体介绍每种药物。具体建议如下所述。

1. 阿扎那韦

(1)药理学：阿扎那韦(atazanavir，ATV)为阿扎肽类蛋白酶抑制剂，与其他肽类蛋白酶抑制剂的结构不同。其生物利用度不确定，血浆半衰期为 7 h，然而随餐服用可使其生物利用度升高。86% 的阿扎那韦与蛋白结合并可进入中枢神经系

统[40]。在肝中，由 CYP3A4 进行代谢，并且阿扎那韦同时也是该酶的抑制剂。其代谢产物经粪便(79%)和尿(13%)排出体外。阿扎那韦通过胎盘的量很少。它是 P-糖蛋白的抑制剂、诱导剂和底物[7]。

阿扎那韦优势在于每天只需给药一次，同时具有很高的抗药性遗传屏障。在富马酸替诺福韦酯(或替诺福韦)-恩曲他滨方案中，推荐使用 RTV 或考比司他增强的阿扎那韦代替 PI[5,41]。

(2)药物相互作用：使用阿扎那韦时可能需要调整或注意剂量的药物有抗真菌药、抗心律失常药、克拉霉素、秋水仙碱、口服避孕药、抗惊厥药、利福布汀、勃起功能障碍药、H_2受体拮抗剂、抗酸药和缓冲剂。与阿扎那韦合用的禁忌药物有茚地那韦、奈韦拉平、依曲韦林、依非韦伦(治疗过的患者中)、HCV PI、抗组胺药、贝普地尔、辛伐他汀、洛伐他汀、抗分枝杆菌药、西沙必利、质子泵抑制剂、神经系统药物、麦角衍生物、圣约翰草和伊立替康[5]。

2. 考比司他

(1)药理学：考比司他(cobicistat，COBI)是 RTV 的结构类似物，但对 HIV 或 HCV 没有直接的抗病毒活性。与 RTV 一样可以用作其他抗病毒药物的药物增强剂。是几种固定剂量抗逆转录病毒疗法的组成部分：阿扎那韦-考比司他，达芦那韦-考比司他，埃替拉韦-考比司他-恩曲他滨-富马酸替诺福韦酯(或 TAF)[42-43]。它与 RTV 互换不能提高福沙那韦，沙奎那韦或 TPV 的作用。考比司他应随餐服用。考比司他 97%～98%与蛋白质结合。半衰期为 3～4 h(使用 ATZ 时比达芦那韦更长)，通过粪便和尿排泄。考比司他是 CYP3A4 的底物和强抑制剂，也是 CYP2D6 和 P-糖蛋白的抑制剂。

(2)药物相互作用：作为 HIV PI 的类似物，考比司他具有相似的药物相互作用特征。其不应与任何和 RTV 共同起作用的 PI(福沙那韦、SQV，TPV、LPV)一起使用。其他禁忌药物包括依非韦伦、ETV、NVP、抗心律失常药、大环内酯/酮内酯抗生素、抗真菌药、抗分枝杆菌药、HCV 抗病毒药、神经系统药物、勃起功能障碍药物和抗惊厥药。

3. 达芦那韦

(1)药理学：达芦那韦(darunavir，DRV)单独使用其生物利用度仅有 37%，而由利托那韦增强时可达 82%，增强时血清的半衰期为 15 h。该药需随餐服用。血浆中 95%与蛋白结合，主要是酸性糖蛋白。达芦那韦由 CYP3A4 在肝脏中代谢，同时也是该酶的抑制剂，并且是 CYP2C9 和 P-糖蛋白的诱导剂。该药经粪便(79.5%)和尿(13.9%)排出体外。推荐达芦那韦与增强剂利托那韦合用，作为以蛋白酶抑制剂为基础治疗方案的首选药物联合 2 种核苷逆转录酶抑制剂或核苷酸逆转录酶抑制剂用于初治患者和孕妇[7]。

(2)药物相互作用：需要调整剂量的药物有抗抑郁药帕罗西汀和盐酸舍曲林、勃起障碍药物、抗真菌药、阿托伐他汀和瑞舒伐他汀。禁忌的药物有依非韦伦、依曲韦林、NVP、HCV PI、神经系统药物、洛伐他汀、辛伐他汀、抗分枝杆菌药、麦角衍生物、圣约翰草、西沙必利、抗惊厥药和氟替卡松。

4. 福沙那韦

(1)药理学：福沙那韦(fosamprenavir，FPV)是没有抗病毒活性的前体药物，必须经细胞磷酸化转化为安瑞那韦(amprenavir，APV)[44]。安瑞那韦的生物利用度尚未确定，其血浆半衰期为 7.7 h。该药可随餐或空腹服用。90% 药物与血浆蛋白结合。安瑞那韦在肝中由 CYP3A4 代谢，同时该药既是 CYP3A4 的抑制剂也是诱导剂[45]。安瑞那韦经粪便(75%)和尿(14%)排出体外。不清楚安瑞那韦是否通过胎盘[7]。通过利托那韦增强的福沙那韦具有很高的中枢神经系统通透性[16]。然而，不建议该药用于初治患者[5]。

(2)药物相互作用：使用福沙那韦时可能需要调整或注意剂量的药物有勃起障碍药物、抗真菌药、依非韦伦、NVP、LPV/r、沙奎那韦、RTV、利福布汀、阿托伐他汀和美沙酮。与福沙那韦并用的禁忌药物包括依曲韦林、DLV、HCV 蛋白酶和 NS5A 抑制剂、辛伐他汀、洛伐他汀、抗分枝杆菌药、强心剂、西沙必利、神经系统药物、抗组胺药、麦角衍生物、圣约翰草和口服避孕药[5,21]。

5. 茚地那韦

(1)药理学：茚地那韦(indinavir，IDV)的生物利用度为 65%，其血浆半衰期为 1.5～2.0 h。茚地那韦应与低热量、低脂食物同时服用。该药 60% 与血浆蛋白质结合，大部分是酸性糖蛋白[46]。IDV 是 CYP3A4 的底物和抑制剂。茚地那韦是 CYP3A4 的抑制剂。大部分药物(83%)

代谢后经粪便排出。该药通过胎盘的剂量很小[7]，但是在利托那韦增强剂的作用下可以进入中枢神经系统[16,47]。

因为给药不便（无增强剂）并且有肾结石（利托那韦增强）的不良反应，所以无论有没有利托那韦增强剂，都不推荐茚地那韦作为以蛋白酶抑制剂为基础的治疗方案中的成分用于初治患者[5]。

（2）药物相互作用：与茚地那韦合用时可能需要调整或注意剂量的药物包括 DLV、ddI、依非韦伦、奈非那韦、NVP、RTV、沙奎那韦、抗心律不齐药、抗真菌药、抗惊厥药、钙通道阻滞剂、阿托伐他汀、美沙酮、秋水仙碱和维生素 C，尤其是葡萄汁；与茚地那韦合用的禁忌药物包括阿扎那韦、替拉那韦、胺碘酮、辛伐他汀、洛伐他汀、抗分枝杆菌药、麦角衍生物、神经系统药物、西沙必利、勃起功能障碍药物和圣约翰草[5,21]。

6. 洛匹那韦-利托那韦

（1）药理学：洛匹那韦只允许和小剂量利托那韦合用（LPV-r），其复合配方已商品化销售。洛匹那韦-利托那韦（lopinavir-ritonavir）的生物利用度未知，其半衰期为 5～6 h。口服片剂可随餐或空腹服用；口服溶液应与含脂适量的食物同服。该药 99% 与血浆蛋白结合，主要是酸性糖蛋白。洛匹那韦-利托那韦是 CYP3A4 和 CYP2D6 的抑制剂和底物。其代谢产物主要由粪便（82.6%）和尿（10.4%）排出。洛匹那韦可通过胎盘[7]。该药具有很高的中枢神经系统通透性[16]，作为以蛋白酶抑制剂为基础的治疗方案中的备选药物与 2 种核苷逆转酶抑制剂和（或）核苷酸逆转酶抑制剂用于初治患者[5]。

（2）药物相互作用：与洛匹那韦-利托那韦合用时可能需要调整剂量的药物有勃起功能障碍药物、瑞舒伐他汀、阿伐他汀、钙离子阻滞剂和美沙酮。禁忌药物有地瑞拉韦、福沙那韦、替拉那韦、辛伐他汀、洛伐他汀、口服避孕药、神经系统药物、抗惊厥药、抗心律失常药、抗分枝杆菌药、抗组胺药、西沙必利、强心药、HCV 抗病毒药、麦角衍生物、麦角酸、麦草酸和氟替卡松[5,21]。

7. 奈非那韦

（1）药理学：奈非那韦（nelfinavir，NFV）的生物利用度为 20%～80%，血浆半衰期为 3.5～5.0 h。在所有蛋白酶抑制剂中，奈非那韦细胞内的累积量最大，然而，该药 98% 以上与蛋白相结合[35]。奈非那韦应随餐服用，它既是 CYP3A4 的抑制剂也是诱导剂[45]。大部分药物（87%）由粪便排出，通过胎盘的剂量很少[7]，并具有较低的中枢神经系统通透性[16]。由于奈非那韦抗逆转录病毒的有效率较低，因此，奈非那韦在联合 2 种核苷/核苷酸逆转录酶抑制剂的方案中，不建议其作为以蛋白酶抑制剂为基础的成分用于初治患者[5]。利托那韦增强并不影响药物剂量。

（2）药物相互作用：需要调整或注意使用剂量的药物有利福布汀、阿伐他汀、美沙酮和勃起功能障碍药物；与奈非那韦合用的禁忌药物包括 TPV、抗心律失常药、辛伐他汀、洛伐他汀、抗分枝杆菌药、西沙必利、神经系统药物、抗组胺药、麦角衍生物、圣约翰草、质子泵抑制药和口服避孕药[5,21]。

8. 利托那韦

（1）药理学：利托那韦（ritonavir，RTV）的口服生物利用度未知，其血浆半衰期为 3～5 h。利托那韦需要随餐服用。该药 98% 与血浆蛋白结合，并被 CYP3A 代谢。其主要代谢产物是与原药具有同样抗病毒活性的异丙基噻唑。利托那韦由粪便（86.4%）和尿（11.3%）排出体外[5]。通过胎盘的量很少[7]。

因为利托那韦是 CYP3A4 的强抑制剂，所以在目前 HIV 的治疗中它最主要的作用是增强第二种蛋白酶抑制剂的药代动力学[38]。低剂量的利托那韦是茚地那韦、福沙那韦、沙奎那韦、洛匹那韦、阿扎那韦、替拉那韦和达芦那韦的增强剂。由于胃肠道不耐受，因此不建议利托那韦单独用于以蛋白酶抑制剂为基础的方案中[5]。推荐利托那韦增强的蛋白抑制剂与 2 种核苷/核苷酸逆转录酶抑制剂联合组成以蛋白酶抑制剂为基础的治疗方案用于初治和已经治疗过的患者[5,38]。

（2）药物相互作用：一般而言，利托那韦是 CYP3A4 非常强的抑制剂，需要密切监测很多潜在的药物相互作用[5,21]。可能需要调整或注意剂量的合用药物包括抗真菌药、克拉霉素、阿托伐他汀、普伐他汀、瑞舒伐他汀、抗惊厥药、美沙酮、勃起功能障碍药物、阿托伐醌、奎宁、抗抑郁药和茶碱。与利托那韦合用的禁忌药物有依曲韦林、抗心律失常药、辛伐他汀、洛伐他汀、抗分枝杆菌药、西沙必利、神经系统药物、麦角衍生物、口服避孕药和圣约翰草。

9. 沙奎那韦

(1)药理学:沙奎那韦(saquinavir,SQV)的口服生物利用度只有 4% 左右,血浆半衰期为 1~2 h。沙奎那韦是 CYP3A4 和 P-糖蛋白的底物及抑制剂。需随餐服用。该药 97% 与血浆蛋白结合,主要从粪便(81%)排出[5]。沙奎那韦通过胎盘的量很少[7],并且具有较低的中枢神经系统通透性[16]。无论有无利托那韦增强都不推荐沙奎那韦与 2 种核苷/核苷酸逆转录酶抑制剂联合用于初治患者[5]。

(2)药物相互作用:需要调整或注意使用剂量的合用药物有抗真菌药、抗心律不齐药、阿伐他汀、瑞舒伐他汀、抗惊厥药、美沙酮、勃起功能障碍药物、质子泵抑制药和葡萄汁。

与沙奎那韦合用的禁忌药物包括替拉那韦、达芦那韦、抗组胺药、氟替卡松、辛伐他汀、洛伐他汀、抗分枝杆菌药、西沙必利、神经系统药物、口服避孕药、麦角衍生物、HCV 抗病毒药、圣约翰草、大蒜补充剂和地塞米松[5,21]。

10. 替拉那韦

(1)药理学:替拉那韦(tipranavir,TPV)是一种非肽类蛋白酶抑制剂[48]。口服生物利用度未知,其半衰期为 6 h。可随餐或空腹服用。99.9% 以上的替拉那韦与血浆白蛋白和酸性糖蛋白结合。它主要通过 CYP3A4 代谢,也是 CYP3A4 和 CYP2C19 的诱导剂。经粪便(82.3%)和尿(4.4%)排出体外。不清楚替拉那韦是否能通过胎盘[7],其中枢神经系统通透性很低[16]。替拉那韦需与利托那韦合用以达到有效的血浆药物浓度[37,49]。不推荐替拉那韦用于以蛋白酶抑制剂为基础的方案中治疗初治患者。目前用药指征仅限于多次治疗过的患者或者感染了对多种蛋白酶抑制剂耐药的病毒株的患者。

(2)药物相互作用:与替拉那韦合用需要调整剂量的药物有:秋水仙碱、瑞舒伐他汀、美沙酮、抗真菌药和抗惊厥药。禁止同时使用以下药物:阿扎那韦、依曲韦林、福沙那韦、洛匹那韦、奈非那韦、沙奎那韦、强心剂、抗分枝杆菌药、洛伐他汀、辛伐他汀、神经系统药物、麦角衍生物、西沙必利、抗组胺药、HCV 抗病毒药、口服避孕药、勃起功能障碍药物、圣约翰草和氟替卡松[5,37,49]。

(四)进入抑制剂

以 HIV 进入宿主细胞为目标的新型抗逆转录病毒药物有了新进展。恩夫韦肽(T20)是一种融合抑制剂,也是这类药物首先获批的药物。恩夫韦肽是人工合成的由 36 个氨基酸组成的链状多肽,可结合于 HIV-1 包膜糖蛋白 gp41 亚基的七残基重复序列的开端。该肽的序列来自于 HIV-1LAI,B 亚型病毒株)[50]。这种结合阻止了病毒包膜与细胞膜融合所必需的构象变化[51]。阻止了病毒进入,从而使宿主细胞免于感染。

马拉维诺(Maraviroc,MVC)是趋化因子受体 CCR5 的拮抗剂,它是第二个针对病毒进入的药物。该药的使用取决于病毒本身的亲嗜性,因为只有利用 CCR5 辅助受体(R5)的病毒株才对该药敏感。该药抗病毒的原理是 HIV-1 感染初期大多表现为 CCR5 辅助受体嗜性,之后在感染的进程中逐渐转换为 CX-CR4 嗜性或双嗜性。马拉维诺与 CCR5 辅助受体的变构结合导致了构象改变,抑制了 HIV-1 gp120 的结合,从而阻止病毒进入靶细胞[52]。

1. 恩夫韦肽

(1)药理学:恩夫韦肽(enfuvirtide,T20)皮下注射的生物利用度为 84%[51],血浆半衰期为 3.8 h。恩夫韦肽 92% 与血浆蛋白相结合。据推测,该药的代谢产物为氨基酸组分,可进入体内的氨基酸池并循环利用。恩夫韦肽不具有抗 HIV-2 的活性,但最近的资料表明该药具有抗非 B 亚型 HIV-1 作用的同时对 O 群 HIV-1 也可能有效[53]。有限的资料提示恩夫韦肽不能通过胎盘[7],而且也不能进入中枢神经系统[54]。由于抗药性较低,分娩时需要注射给药,因此,不推荐恩夫韦肽用于以非核苷逆转录酶抑制剂或蛋白酶抑制剂为基础的方案中治疗初治患者。目前该药仅用于已经治疗过但对当前抗逆转录病毒治疗无效的患者的挽救治疗方案中[7,55]。

(2)药物相互作用:没有证据表明恩夫韦肽是任何 CYP450 同工酶的诱导剂或抑制剂;因此,该药似乎与通过 CYP450 系统代谢的任何药物之间不存在相互作用。与其他抗逆转录病毒药物间未见明显的相互作用[51]。

2. 马拉维诺

(1)药理学:马拉维诺(maraviroc,MVC)与 HIV-1 的 R5 病毒株的 CCR5 辅助受体结合,但没有抗 X4 病毒株的活性。该药生物利用度为 33%,血浆半衰期为 14~18 h,76% 与血浆中的白蛋白和酸性糖蛋白结合,可随餐或空腹服用。

马拉维诺由 CYP3A4 进行代谢并且由粪便(76%)和尿(20%)排出体外，并不清楚它是否能通过胎盘[7]。虽然马拉维诺与2种核苷/核苷酸逆转录酶抑制剂联合可用于感染 CCR5 嗜性病毒的初治患者，但它并不是首选或备选的药物，因为该药需要一天两次给药并且需要做病毒亲嗜性检测[7,56]。

(2)药物相互作用：与马拉维诺合用的以下药物需要调整剂量：抗真菌药、抗惊厥药、利福布汀、依非韦伦、考比司他增强的埃替拉韦(埃替拉韦/c)、raltegravir(RAL)、依曲韦林和除 TPV 外的所有 PI。禁忌与抗分枝杆菌药、HCV 抗病毒药和圣约翰草同时服用。

(五)整合酶链转移抑制剂

整合酶链转移抑制剂是一类以 HIV-1 整合酶为靶点的抗逆转录病毒药物。HIV-1 整合酶介导逆转录的 HIV-1DNA 转移进入宿主染色体内。该酶的活性包括 3′加工和链转移，前者在逆转录 DNA 双链的3′末端产生羟基，后者将病毒和宿主 DNA 连接起来。推荐获批的整合酶抑制剂与2种 NRTI/NtRTIs 作为初治患者的首选治疗[1,7]。

1. 拉替拉韦

(1)药理学：拉替拉韦(raltegravir，RAL)对分离出的 HIV-1 O 群[28]和 HIV-1 M 群，以及 HIV-2[57]都具有抗病毒活性。该药生物利用度尚未确定，血浆半衰期为7～12 h。在血浆中83%与蛋白结合。拉替拉韦可通过胎盘[7]。该药可随餐或空腹服用，经粪便(51%)和尿(32%)排出体外。经尿苷二磷酸葡萄糖醛酸转移酶(UGTA1)葡萄糖醛酸化后清除，不经 CYP450 酶代谢。对于初治患者，目前推荐拉替拉韦与恩曲他滨-富马酸替诺福韦酯或替诺福韦作为以整合酶链转移抑制剂为基础的首选治疗方案[5,58-59]。

(2)药物相互作用：拉替拉韦并不是 CYP450 的诱导剂或抑制剂。因此，与其他类型抗逆转录病毒药物相互作用的大多数药物的药代动力学不受该药影响[5,57,59]。以下合用药物可能需要调整剂量：抗酸药、抗分枝杆菌药、抗惊厥药、依曲韦林和 RTV 加强的 TPV(TPV/r)。

2. 埃替拉韦

(1)药理学：目前，埃替拉韦(elvitegravir，EVG)仅获准与其他抗病毒药物组合并外加考比司他(埃替拉韦＋考比司他＋替诺福韦酯＋恩曲他滨)以复方形式使用。埃替拉韦只有与药代动力学增效剂(考比司他)合用时才能达到治疗浓度。该药血浆半衰期为13 h，血浆中99%与蛋白相结合[60]。埃替拉韦应随餐服用，其进入脑脊液和通过胎盘的水平未知。推荐埃替拉韦＋考比司他＋替诺福韦酯＋恩曲他滨组合片作为初治患者的备选方案[5]。

埃替拉韦是 CYP3A4 底物和 CYP2C9 诱导剂。考比司他是为了使用埃替拉韦而开发出来的，因为它本身没有抗 HIV 的活性，但是和利托那韦类似，它也是 CYP3A4 的强抑制剂。考比司他可使较低使用剂量的埃替拉韦能够达到较高的浓度[61]。考比司他也可以作用于胃肠转运蛋白来增强其他抗 HIV 药物的吸收，包括阿扎那韦和达芦那韦[42-43,59]。

(2)药物相互作用：埃替拉韦基本上由 CYP450 通路代谢，因此会与使用这条通路的其他药物发生相互作用。因为埃替拉韦仅以复方片剂销售，涉及埃替拉韦相互作用的数据缺乏。埃替拉韦＋考比司他＋替诺福韦酯＋恩曲他滨合剂与抗酸药物的使用应间隔2 h以上。合用的禁忌药物有 NVP、RPV、阿扎那韦与考比司他(阿扎那韦/c)[或 RTV (阿扎那韦/r)]、达芦那韦/c(或 r)、福沙那韦/r、LPV/r、沙奎那韦/r、TPV/r、分枝杆菌药、抗惊厥药、抗抑郁药、抗真菌药、神经系统药物、HCV 抗病毒药、麦角衍生物、洛伐他汀、辛伐他汀和圣约翰草[5]。

3. 多替拉韦

(1)药理学：多替拉韦(dolutegravir，DTG)可用于初治的和已经治疗过的 HIV 患者，与其他现有整合酶链转移抑制剂即拉替拉韦和埃替拉韦之间没有发现交叉耐药[62]。多替拉韦的半衰期长达14 h，因此入选患者只需每天服药1次。对于已知或怀疑整合酶链转移抑制剂耐药的患者及与依非韦伦、福沙那韦-利托那韦、替拉那韦-利托那韦或利福平合用时，多替拉韦的推荐剂量是每天2次[63]。该药可随餐或空腹服用[64]。经粪便(53%)和尿(31%)排出体外。多替拉韦不抑制 CYP450，因此，它不与经这些酶代谢的药物发生相互作用(与拉替拉韦一样)。

(2)药物相互作用：与下列药物合用时可能需要调整剂量：抗惊厥药，依非韦伦，福沙那韦/r，

TPV/r 和分枝杆菌药物。与多替拉韦合用的禁忌药物有：卡马西平、苯妥英钠、NVP、苯巴比妥和圣约翰草。

二、抗丙型肝炎病毒的药物

因丙型肝炎病毒（HCV）的基因组和病毒学认识的提高，HCV 治疗的功效和耐受性不断增加。已开发出多种干扰 HCV 复制特定步骤的直接抗病毒作用的药物（direct-acting antivirals, DAAs），产生无干扰素、泛基因型和每天单剂量给药的联合治疗方案。根据其作用机制和治疗目标定义的四类 DAA 是非结构蛋白 3/4A（NS3/4A）PIs，NS5B 核苷聚合酶抑制剂、NS5B 非核苷聚合酶抑制剂和 NS5A 抑制剂[65]。DAAs 有多种固定剂量组合（表 113-2）。虽然 RBV 仍与 DAAs 联合使用，但由于干扰素耐受性差，基于干扰素的治疗方案不再使用。鉴于 HCV 治疗方案的快速变化，请访问 www.hcvguidelines.org 获取最新信息[66]。

表 113-2 治疗丙型肝炎病毒（HCV）的抗病毒药物[a]

抗病毒药物（缩写）	商标名（制药公司）[b]	作用机制/给药途径	主要的不良反应
利巴韦林（RBV）	Copegus（Roche）；Rebetol（Merck）	机制不清楚；仅与 DAA 联合口服	贫血[c]、心肌梗死、致畸、过敏、肺功能损害、胃肠道症状[d]
索磷布韦（SOF）	Sovaldi（Gilead）	HCV NS5B 聚合酶的核苷酸类似物抑制剂；抑制病毒 RNA 合成；口服	疲劳、失眠、头痛、胃肠道症状、胺碘酮性心动过缓
西咪匹韦（SMV）	Olysio（Janssen）	结合于 NS3 活性部位，阻止病毒复制，口服	对光敏感、皮疹、胺碘酮性心动过缓
索磷布韦（SOF）＋雷迪帕韦（LDV）	Harvoni（Gilead）	NS5A 抑制剂（LDV）及 HCV NS5B 聚合酶核苷酸类似物抑制剂（SOF）；口服	疲劳、失眠、头痛、胃肠道症状
奥比他韦＋帕立瑞韦＋利托那韦＋达塞布韦	Viekira Pak（AbbVie）	NS5A 抑制剂（奥比他韦），NS3/4A 蛋白酶抑制剂（帕立瑞韦）、RNA 聚合酶抑制剂（达塞布韦）；利托那韦是无抗 HCV 活性的 HIV 蛋白酶抑制剂	疲劳，皮疹，胃肠道症状，失眠，瘙痒
奥比他韦＋帕立瑞韦＋利托那韦	Technivie（AbbVie）	与上述抗病毒药物组合相同，不含达塞布韦	同上
格佐匹韦＋艾尔巴韦	Zepatier（Merck）	NS5A 抑制剂（艾尔巴韦），NS3/4A 蛋白酶抑制剂（艾尔巴韦）	疲劳、头痛、胃肠道症状
达拉他韦	Daklinza（Bristol-Meyers Squibb）	与索菲布韦合用的 NS5A 抑制剂	疲劳、头痛
维帕他韦＋索磷布韦	Epclusa（Gilead）	NS5A 抑制剂（维帕他韦），NS5B 抑制剂（索磷布韦）	疲劳、头痛
伏西瑞韦＋维帕他韦＋索磷布韦	Vosevi（Gilead）	蛋白酶抑制剂（伏西瑞韦）、NS5A 抑制剂（维帕他韦）、NS5B 抑制剂（索磷布韦）	头痛、疲劳、胃肠道症状
格来普韦＋哌仑他韦	Mavyret（Gilead）	蛋白酶抑制剂（格来普韦），NS5A 抑制剂（哌仑他韦）	头痛、疲劳

注：[a] 应注意，所有 DAA HCV 抗病毒药均警告说，在接受 HCV 治疗但未感染 HBV 的并发感染患者中，据报道有 HBV 激活，可导致暴发性肝炎。[b] 制药公司：伊利诺伊州北芝加哥的 AbbVie；新泽西州普林斯顿的 Bristol-Meyers Squibb；Genentech，加利福尼亚州旧金山；加利福尼亚州福斯特城的吉利德；Janssen Pharmaceutica，比利时比尔；默克公司；新泽西州怀特豪斯站；罗氏制药公司（Nutley，NJ）。[c] 利巴韦林可通过溶血或减少红细胞产生而引起贫血。[d] 胃肠道（gastrointestinal，GI）症状包括恶心、呕吐和腹泻

（一）NS3/4A 蛋白酶抑制剂

NS3/4A PIs 通过阻断 NS3 催化位点或 NS3/NS4A 相互作用来抑制 HCV 蛋白翻译后加工过程中涉及的丝氨酸蛋白酶。此外，NS3/NS4A 蛋白酶抑制剂还可阻止干扰素 βTIR 结构域衔接蛋白（TRIF）介导的 Toll 样受体和 Cardif 介导的视黄酸诱导性基因 1 信号传导的阻滞，从

而促进干扰素的诱导、促进病毒的清除[67]。第一代 PIs 特拉普韦和博西帕韦已被更有效、耐受性更强的抗病毒药取代。格拉瑞韦、帕立瑞韦、西咪匹韦、伏西拉韦和格卡瑞韦是美国提供的蛋白酶抑制剂。

1. 格拉瑞韦

(1)药理学:格拉瑞韦(grazoprevir)是一种全基因型蛋白酶抑制剂,仅可与 NS5A 抑制剂艾尔巴韦(elbasvir)联合使用[68]。格拉瑞韦的吸收不受食物影响,生物利用度为 27%。它主要分布于肝脏,与蛋白质高度结合。通过肝代谢,半衰期为 31 h,主要通过粪便排泄。可以用于任何程度的肾功能不全的患者,包括透析患者,无需调整剂量。Child-Pugh B 级或 C 级肝硬化患者禁用。

(2)药物相互作用:格拉瑞韦通过 CYP3A 酶代谢,不可与该系统的中度和强诱导剂或强抑制剂一起使用[69]。格拉瑞韦是 OATP1B1/3 的底物,不可与抑制该酶的药物合用。与格拉瑞韦禁用的药物有:利福平、苯妥英钠、卡马西平、圣约翰草、环孢菌素和某些抗逆转录病毒药物(如 PI 和依非韦伦)。不建议与那夫西林,酮康唑、依曲韦林、考比司他或莫达非尼共同给药。

2. 帕立瑞韦

(1)药理学:帕立瑞韦(paritaprevir)与低剂量 RTV 共用以增强药理作用,这些药物可与奥比他韦(ombitasvir)固定剂量联合使用,后者是一种 NS5A 抑制剂[70]。奥比他韦、帕立瑞韦和利托那韦通常与非核苷 NS5B 抑制剂达塞布韦(dasabuvir)一起使用。随餐服用时,帕立瑞韦可良好吸收,生物利用度为 53%,且与蛋白质高度结合。它的半衰期为 5.5 h,通过粪便排泄。肾功能不全不会影响帕立瑞韦的水平,轻度肝功能不全无须调整剂量。在中度至重度(Child-Pugh B 级和 C 级)肝功能不全者禁用。

(2)药物相互作用:帕立瑞韦经 CYP3A4 代谢,少量经 CYP3A5 代谢[71]。禁忌同时服用的常见药物是抗惊厥药、利福平、圣约翰草、某些口服避孕药和沙美特罗。必须密切监测他汀类药物、环孢素、他克莫司和抗心律失常药。

3. 西咪匹韦

(1)药理学:西咪匹韦(simeprevir,SMV)是第一个可用的第二代蛋白酶抑制剂,与索磷布韦联合使用或不联合使用 RBV 用于慢性基因 1 型感染[72]。随餐服用,生物利用度为 62%,与蛋白质的结合度很高。它的半衰期为 41 h,主要经粪便排泄。肾功能不全时无须调整剂量,不建议在中度或重度(Child-Pugh B 和 C 级)肝功能不全的患者中使用。

(2)药物相互作用:西咪匹韦通过 CYP3A4,也可能通过 CYP2C8 和 CYP2C19 进行氧化代谢[72]。这些酶的重要诱导剂或抑制剂会导致西咪匹韦浓度改变。反过来,西咪匹韦可通过抑制 OATP1B1/3 影响其他药物血浆浓度。不推荐与 RTV、HIV PI、依非韦伦、NVP、他汀类药物、圣约翰草和环孢菌素等合用。西咪匹韦可以与他克莫司或西罗莫司合用。

4. 伏西拉韦

(1)药理学:伏西拉韦(voxilaprevir)是 NS3/4A 蛋白酶的全基因型抑制剂,已与索磷布韦和维帕他韦结合用于治疗过但病毒学应答抵抗的患者[73]。吸收良好,与蛋白质高度结合,主要经粪便排泄。轻度或中度肾功能不全无须调整剂量,不建议中度或重度肝功能不全的患者使用。

(2)药物相互作用:伏西拉韦经 CYP3A4 代谢。不建议与苯妥英、苯巴比妥、奥卡西平、利福布汀、利福喷丁、阿扎那韦、LPV、TPV、依非韦伦和环孢菌素并用[74]。

5. 格卡瑞韦

(1)药理学:格卡瑞韦(glecaprevir)是 NS3/4A 蛋白酶的全基因型抑制剂,已与 NS5A 抑制剂哌仑他韦联合配制用于治疗过的病毒学应答抵抗的患者[75]。与蛋白质高度结合,主要经粪便排泄。对于轻度、中度或重度肾功能不全,包括透析患者,无需调整用药剂量。不建议中度或重度肝功能不全的患者使用。

(2)药物相互作用:格卡瑞韦经 CYP3A 代谢。不建议与地高辛、卡马西平、利福平、含乙炔雌二醇的药物(如联合口服避孕药)、圣约翰草、阿扎那韦、达芦那韦、LPV、RTV、HMG-CoA 还原酶抑制剂和环孢菌素合用[75]。

(二)NS5A 抑制剂

NS5A 是 HCV 病毒复制和组装所必需的一种非结构蛋白[76-77]。但是,它参与此过程的分子机制仍不明确。虽 NS5A 抑制剂对所有基因型均有效,但阻碍耐药性和可变毒性的能力弱。与其

他具有或不具有 RBV 的直接抗病毒药联合使用时，NS5A 抑制剂在基因型 1 感染患者中 SVR 率很高[78-79]。NS5A 抑制剂有来迪派韦、奥比他韦、艾尔巴韦、维帕他韦和哌仑他韦，每种抑制剂都可以与其他直接抗病毒药和达拉他韦固定剂量联合使用。

1. 来迪派韦

(1)药理学：来迪派韦(ledipasvir)与索非布韦共用，并根据患者不同选择使用 RBV 或不使用 RBV[78]。来迪派韦吸收良好，与蛋白质高度结合。它的半衰期为 47 h，主要经粪便排泄。严重肾功能不全者使用来迪派韦无需调整剂量，但严重肾功能受损时可致与其共同配制药物索非布韦的累积。轻度或中度肾功能不全或在中度或重度肝功能不全(儿童 Pugh B 级或 C 级)情况下不需调整剂量。

(2)药物相互作用：来迪派韦缓慢氧化代谢机制未知，是 P-糖蛋白药物转运蛋白的底物[78]。不建议与利福平、圣约翰草、卡马西平、苯妥英钠、苯巴比妥或 TPV 并用。胃 pH 升高可降低其吸收。若需要，可并用小剂量抑酸剂。

2. 奥比他韦

(1)药理学：奥比他韦(ombitasvir)仅可与 PIs paritaprevir 和 RTV 固定剂量共同配制使用，后者通常与 NS5B 抑制剂 dasabuvir 一起使用[70]。根据患者人群的不同，这些药物可与 RBV 一起或不与 RBV 一起使用来治疗慢性基因型 1 感染[80]。奥比他韦-paritaprevir-RTV 与 RBV 并用(不含 dasabuvir)用于基因型 4 感染[81]。随餐服用，奥比他韦吸收良好，生物利用度为 48%。它的半衰期为 21～25 h，主要经粪便排泄。肾功能不全不会显著改变其水平，但尚未在严重肾功能不全的患者中研究奥比他韦血浆变化。禁止将其用于中度至重度(Child-Pugh B 级和 C 级儿童)肝功能不全的患者。

(2)药物相互作用：奥比他韦通过酰胺水解和氧化代谢[70]，与经 CYP3A4 和 CYP3A5 代谢的 paritaprevir 和 RTV 共同配制，固定剂量组合具有相当大的药物相互作用，因此，不建议与抗惊厥药、利福平、圣约翰草、某些口服避孕药或沙美特罗共用。

3. 艾尔巴韦

(1)药理学：艾尔巴韦(elbasvir)仅可与 PI 和 grazoprevir 固定剂量组合使用[69]。根据某些患者的特征，可有或无 RBV 时使用艾尔巴韦[82]。在使用该药前，应对基因型 1a 感染的患者进行 NS5A 耐药相关替代的检测。艾尔巴韦生物利用度为 32%，并与蛋白质高度结合。半衰期为 24 h，主要经粪便排泄。可以用于任何程度的肾功能不全的患者，无须调整剂量。Child-Pugh B 级或 C 级肝硬化患者忌用。

(2)药物相互作用：艾尔巴韦与其共同配制的药物 grazoprevir 一样，经 CYP3A 部分氧化代谢[69]。禁忌与利福平、苯妥英钠、卡马西平、圣约翰草、环孢菌素和某些抗逆转录病毒药物(如 PI 和 EFV)同时使用。不建议与那夫西林、酮康唑、依曲韦林、考比司他或莫达非尼共用。

4. 维帕他韦

(1)药理学：维帕他韦(velpatasvir)是一种全基因型 NS5A 抑制剂，仅可与 NS5B 抑制剂 sofosbuvir 以固定剂量联合使用[83]。与蛋白质高度结合，半衰期为 15 h。主要经粪便排泄。轻度或中度肾功能不全或 Child-Pugh B 级或 C 级肝功能不全时无需调整剂量。初步研究表明，严重的肾损害不会影响维帕他韦的血浆水平。但是，肾功能损害时会导致其共同配制的药物索非布韦累积。

(2)药物相互作用：维帕他韦是 P-糖蛋白的底物，不建议与利福平、利福布汀、利福喷丁、圣约翰草、卡马西平、苯妥英钠、苯巴比妥、奥卡西平或 TPV 共同使用[83]。胃 pH 升高会降低其吸收。若需要使用抑酸剂，可使用小剂量质子泵抑制药，维帕他韦需空腹服用。

5. 哌仑他韦

(1)药理学：哌仑他韦(pibrentasvir)是一种 NS5A 抑制剂，与 glecaprevir 联合配制用于治疗过的病毒学抵抗的患者[75]。与蛋白质高度结合，主要经粪便排泄。轻度、中度或重度肾功能不全，包括透析患者，无须调整剂量。不建议中度或重度肝功能不全的患者使用。

(2)药物相互作用：哌仑他韦代谢率低，并经粪便排泄[75]。其与经 CYP3A 代谢的 glecaprevir 共同配制使用，可与地高辛、卡马西平、利福平、含乙炔雌二醇的药物(如联合口服避孕药、圣约翰草、阿扎那韦、达芦那韦、LPV、RTV、HMG-CoA 还原酶抑制剂)共同给药，不建议使用环孢菌素。

6. 达拉他韦

(1)药理学:达拉他韦(daclatasvir)与索磷布韦联合应用[79]。生物利用度为 67%,与蛋白质高度结合。它的半衰期为 12~15 h,主要经粪便排泄。肾或肝功能不全用药剂量不需要调整。

(2)药物相互作用:达拉他韦主要经 CYP3A4 代谢,不可与该酶的强诱导剂或抑制剂联合使用[84]。不建议与利福平、苯妥英钠、卡马西平或圣约翰草同时服用。达拉他韦也是 P-糖蛋白转运蛋白和有机阴离子转运多肽 1B1 和 1B3 的抑制剂。当地高辛与达拉他韦合用时,需要调整剂量。

(三)NS5B RNA 依赖性 RNA 聚合酶抑制剂

NS5B 是 RNA 依赖性 RNA 聚合酶,也参与翻译后加工。它的结构在所有 HCV 基因型中都是高度保守的,因此 NS5B 抑制剂对 6 种基因型均具有活性[67]。聚合酶抑制剂有 2 种:核苷/核苷酸类似物(如索磷布韦)和非核苷类似物(如达塞布韦)。核苷/核苷酸类似物通过与核苷酸竞争的磷酸化在肝细胞内被激活,使 RNA 复制终止。核苷聚合酶抑制剂对 6 种基因型均具有中等至高度的功效,并且不易产生耐药性。相反,非核苷聚合酶抑制剂效力较低,而基因型特异性更高,已针对基因型 1 的此类药物均已进行了优化。

1. 索非布韦

(1)药理学:索非布韦(Sofosbuvir,亦称索磷布韦)是第一个研发的 NS5B 核苷聚合酶抑制剂,可与其他抗丙型肝炎直接作用的抗病毒剂以多种组合形式使用[85-86]。可随餐或空腹使用,半衰期为 0.4 h。主要通过尿排泄。对于肾小球滤过率大于 30 ml/min 的患者,无需调整剂量。严重肾功能不全患者(包括透析患者)的索非布韦血浆浓度增加,肝功能损害也可使用。

(2)药物相互作用:索非布韦是 P-糖蛋白药物转运蛋白的底物,因此 P-糖蛋白的诱导剂会降低索非布韦的血浆水平[85]。不建议与利福平、利福布汀、利福喷丁、圣约翰草、卡马西平、苯妥英钠、苯巴比妥、奥卡西平或 TPV 合用。对于有症状的心动过缓和致命性心搏骤停患者,不建议索非布韦和胺碘酮同时使用。

2. 达塞布韦

(1)药理学:达塞布韦(dasabuvir)与 ombitasvir-paritaprevir-RTV 组合包装[70-71]。生物利用度 70%,与蛋白质高度结合。它的半衰期为 6 h,主要经粪便排泄。由于其药效低和耐药阈值高,因此可作为直接抗病毒药的辅助剂。

(2)药物相互作用:达塞布韦经 CYP2C8 和 CYP3A 代谢。不建议与抗惊厥药、利福平、圣约翰草、含乙炔雌二醇的产品或沙美特罗同时使用。

3. 利巴韦林

(1)药理学:据报道利巴韦林(ribavirin,RBV)的生物利用度为 52%[87],并且高脂饮食可将其提高,因此,利巴韦林应随餐服用。该药血浆半衰期为 120~170 h,而且在身体其他部位能存在超过 6 个月。其排出通路尚未确定。利巴韦林似乎不是 CYP450 同工酶的底物。利巴韦林通常与其他抗病毒药物合用作为标准治疗方案用于 HCV 的治疗。利巴韦林单一疗法对 HCV 感染不起作用。

利巴韦林单一疗法用来治疗其他 RNA 病毒,包括呼吸道合胞病毒(respiratory syncytial virus,RSV)、拉沙热病毒、流感病毒、副流感病毒和汉坦病毒。然而,没有系统的数据证明利巴韦林治疗有效[88-95]。一种利巴韦林雾化吸入剂批准用于患有严重 RSV 下呼吸道感染的住院婴幼儿和儿童的治疗。

(2)药物相互作用:禁止去羟肌苷或司他夫定与利巴韦林合用。齐多夫定和利巴韦林合用与贫血高度相关[5,96]。

三、抗乙型肝炎病毒的药物

因为很大比例的患者同时合并 HIV,所以这些药物依据是否具有抗 2 种病毒或只抗 HBV 的活性进行分类。在被批准的药物中,仅替比夫定只用于 HBV,而拉米夫定、富马酸替诺福韦、丙酚替诺福韦、阿德福韦酯(ADV)和恩替卡韦(ETV)可用于 HBV 和 HIV(表 113-3)。虽然目前不建议阿德福韦酯和恩替卡韦用于治疗 HIV,但使用时应避免没有接受压制性抗逆转录病毒治疗方案的 HIV/HBV 合并感染的患者,以免 HIV 产生耐药。尽管恩曲他滨只被批准用于 HIV,但已发现它具有抗 HBV 的活性[97-98]。抗病毒药物作用于这 2 种病毒共同的靶点是 HIV 和 HBV 复制酶的逆转录酶功能[99-101]。

表 113-3 用于 HBV 治疗的抗病毒药物[a]

抗病毒药物(缩写)	商标名(制药公司[b])	作用机制/给药途径	主要的不良反应
阿德福韦酯(ADV)	Hepsera(Gilead)	前体药物转变为单磷酸核苷酸类似物阿德福韦;需由细胞激酶去磷酸化;HBV(RT)抑制剂,病毒DNA链终止子;口服	头痛、乏力、胃肠道症状、肾毒性
恩替卡韦(ETV)	Baraclude(BMS)	HBV逆转录DNA聚合酶鸟苷类似物抑制剂,其功能包括启动、逆转录、正链DNA合成;口服	头痛、疲劳、头晕
拉米夫定(3TC)	参见抗人类免疫缺陷病毒药物表113-1	HBV逆转录DNA聚合酶胞苷类似物抑制剂	毒性最小(参见抗人类免疫缺陷病毒药物)
替比夫定(LdT)	Tyzeka(Novartis)	HBV逆转录DNA聚合酶胸腺嘧啶类似物抑制剂	疲劳、肌酸激酶升高、头痛、肌病、咳嗽、胃肠道症状
替诺福韦(TDF/TAF)	参见抗人类免疫缺陷病毒药物表113-1	HBV DNA聚合酶抑制剂	乏力、头痛、胃肠道症状(参见抗人类免疫缺陷病毒药物)

注:[a] 除干扰素外,所有 HBV 抗病毒药均为 N(t)RTI,其中一些具有抗 HIV 活性(表 113-1),并且都带有乳酸酸中毒和严重脂肪肝不良反应。所有的药物在停止抗乙肝治疗的患者中也都有乙肝严重急性恶化(耀斑)的警告。[b] 制药公司:百时美施贵宝(Bristol-Meyers Squibb),普林斯顿,新泽西州;吉利德(Gilead)科学公司,福斯特市,加利福尼亚州;诺华(Novartis)制药,东汉诺威,新泽西州

慢性 HBV 感染在 HIV 感染患者的发病率和死亡率中起重要作用[102]。合并感染患者抗病毒治疗方案的选择策略基于治疗一种还是 2 种病毒。如果只治疗 HIV,那么同时具有抗 HIV 和 HBV 活性的药物,比如拉米夫定或替诺福韦酯应禁止使用。如果只需治疗 HBV,那么可以使用没有抗 HIV 活性的药物,如替比夫定。然而,建议所有 HIV 和 HBV 合并感染的患者无论 CD4 数量如何马上开始联合抗逆转录病毒治疗,因为这可能延缓肝病的进程[98]。

双核苷逆转录酶抑制剂和(或)核苷酸逆转录酶抑制剂联合抗逆转录病毒方案,如替诺福韦联合拉米夫定或恩曲他滨,是抑制这两种病毒复制的首选方案[98,102]。拉米夫定单独使用会很快出现 HBV 耐药[103],因此,需要将一种核苷逆转录酶抑制剂(拉米夫定或恩曲他滨)和一种核苷酸逆转录酶抑制剂(替诺福韦酯或阿德福韦酯)联合使用。值得注意的是,有 8 种不同的 HBV 基因型(A~H),各有不同的地域倾向[104]。有证据表明基因型影响干扰素的应答。特别是在治疗 e 抗原阳性的慢性乙肝过程中,基因型 A 比基因型 D 的乙肝 e 抗原血清学转换率高,并且基因型 B 的转换率也高于基因型 C[105]。其他抗 HBV 疗法中基因型与治疗应答的相关性尚未确定。

核苷/核苷酸类似物

1. 阿德福韦酯

(1)药理学:阿德福韦(adefovir,ADV)酯是一种双酯药物前体,转化为阿德福韦发挥药物活性。阿德福韦酯不受饮食影响,其生物利用度为 59%。阿德福韦的半衰期为 7.5 h,经肾排出。尚无数据表明该药可以通过胎盘。

阿德福韦最初被用作抗逆转录病毒药物。然而,HIV 治疗所需的高剂量与肾毒性有关[101]。阿德福韦治疗慢性乙肝病毒感染有效。虽然病毒载量的下降速度较慢,但相比其他具有抗 HBV 活性的核苷逆转录酶抑制剂和核苷酸逆转录酶抑制剂而言,其耐药性出现较晚[106]。阿德福韦最基本的作用是治疗拉米夫定耐药的 HBV 感染[107]。然而,对于该指征而言替诺福韦和恩替卡韦很大程度上取代了阿德福韦。

(2)药物相互作用:阿德福韦不是任何 CYP450 同工酶的底物、抑制剂或诱导剂。与拉米夫定、恩替卡韦或替诺福韦之间没有相互作用。降低肾功能或竞争肾小管主动分泌的药物可能增加血中阿德福韦和(或)合用药物的浓度。

2. 恩曲他滨

(1)药理学:见前文关于 HIV 抗病毒药物的讨论和表 113-1。恩曲他滨(FTC)被批准用于 HIV 感染患者的抗病毒治疗。该药有抗 HBV 的活性,但尚未被批准用于 HBV 抗病毒治疗。恩曲他滨和拉米夫定生化性质类似,并且似乎是可以相互替换的用于治疗 HIV-HBV 合并感染的患者。然而,它们有相同的 HBV 耐药突变,因此,不建议这 2 种药物联合治疗[101-102]。此外,和

拉米夫定一样，一旦治疗中断会发生严重的乙肝急性恶化[98]。

(2)药物相互作用：请参阅前文有关 HIV 抗病毒药物的讨论。

3. 恩替卡韦

(1)药理学：恩替卡韦(entecavir，ETV)的生物利用度接近 100%，并且半衰期为 24 h。恩替卡韦应空腹服用。该药主要以原型经肾(62%～73%)排出体外。虽然恩替卡韦具有抗拉米夫定耐药的 HBV 的活性，但是建议对感染拉米夫定耐药 HBV 的患者给予更高的剂量[102]。恩替卡韦抗 HIV 的活性很低，然而，有证据显示其也会出现选择性耐药突变。因此，建议恩替卡韦仅用于正接受有效抗逆转录病毒治疗的 HIV 合并感染的患者[99,102,108]。

(2)药物相互作用：恩替卡韦不是任何 CYP450 同工酶的底物、抑制剂和诱导剂。与拉米夫定、阿德福韦或替诺福韦没有相互作用。降低肾功能或竞争肾小管主动分泌的药物可能增加血中恩替卡韦和(或)合用药物的浓度。

4. 拉米夫定

(1)药理学：见前文关于 HIV 抗病毒药物的讨论及表 113-1。拉米夫定是第一个获批的用于慢性乙肝感染的核苷类似物。因为该药同时具有抗 HIV 和 HBV 的活性，所以它被用作联合抗逆转录病毒方案的一个组成部分来有效降低血清中 2 种病毒的载量。然而，在长期治疗过程中相比 HIV 阴性的患者，合并感染的患者 HBV 特异性耐药突变发生率很高(每年 20%)。选择性 HBV 耐药突变最终降低了慢性肝炎的疗效。HBV 感染患者中断拉米夫定会产生严重的肝炎复发，虽然通常是自限性的，但少数病例是致命的。另一个常见问题是治疗结束后发生的病毒血症反弹[98]。这被认为来源于病毒 cccDNA，它不受核苷或核苷酸疗法的影响并且存在于感染的肝细胞中[101]。对于合并感染的患者，最近的建议指出采用包括替诺福韦在内的双核苷逆转录酶抑制剂-核苷酸逆转录酶抑制剂联合治疗以降低 HBV 拉米夫定耐药株的选择发生率[109]。

(2)药物相互作用：请参阅前文有关 HIV 抗病毒药物的讨论。

5. 替比夫定

(1)药理学：替比夫定(telbivudine，LdT)的生物利用度为 68%，可以随餐或空腹服用。该药半衰期为 40～50 h，大部分经肾排出。替比夫定容易产生耐药，因此，不推荐作为治疗慢性 HBV 的一线用药[110]。也有关于替比夫定停药后肝炎加重的报道。

(2)药物相互作用：替比夫定不改变用于治疗 HBV 的其他核苷或核苷酸类似物(如拉米夫定、阿德福韦或替诺福韦)的药代动力学。与聚乙二醇干扰素 2a 合用可能会增加周围神经病变的风险[99]。

6. 富马酸替诺福韦和丙酚替诺福韦

(1)药理学：见前文关于 HIV 抗病毒药物的论及表 113-1。富马酸替诺福韦(TDF)被批准用于 HBV 和 HIV 感染患者的治疗。与 HBV 拉米夫定耐药突变没有交叉耐药，似乎该药的选择性耐药突变能力较低。因此，在进行抗逆转录病毒治疗的合并感染的患者中，替诺福韦和恩曲他滨或替诺福韦和拉米夫定被推荐作为治疗方案中的双核苷类主要成分以降低 HBV 选择性耐药株产生的可能性[98-99,102,109]。丙酚替诺福韦(tenofovir alafenamide，TAF)是替诺福韦的前体成分，在治疗乙型肝炎方面与富马酸替诺福韦具有同样效果，但剂量要低得多[111]。

(2)药物相互作用：参见前文有关 HIV 抗病毒药物的讨论。

四、抗疱疹病毒药物

已获批的治疗人类 8 种疱疹病毒的大多数抗病毒化合物是抑制 DNA 复制的核苷或核苷酸类似物。其中几种化合物需要由病毒编码酶及细胞激酶磷酸化激活。大部分这类药物的最终靶点是病毒 DNA 聚合酶，虽然 DNA 合成过程中其他的酶也可能被抑制[1]。除了核苷和核苷酸类似物，抗疱疹病毒化合物还包括可直接针对病毒 DNA 聚合酶的焦磷酸盐类似物(膦甲酸)和进入抑制剂(二十二烷醇)。每种药物的结构、作用方式、给药途径和不良反应总结于表 113-4。

1. 阿昔洛韦和伐昔洛韦

(1)药理学：阿昔洛韦(acyclovir，ACV)口服药代动力学已在健康志愿者和免疫力低下的单纯疱疹病毒(herpes simplex virus，HSV)和水痘带状疱疹病毒(varicella-zoster virus，VZV)感染者

中做过评估。缬-阿昔洛韦的血浆蛋白结合率为13.5%～17.9%，阿昔洛韦为22%～33%。以缬-阿昔洛韦形式服用的阿昔洛韦生物利用度为54%，而直接口服阿昔洛韦的生物利用度只有12%～20%。在肾功能正常的患者中阿昔洛韦的半衰期为2.5～3.3 h，但在终末期肾病的患者中升高至14 h[112]。阿昔洛韦可随餐或空腹使用。戊环酯(val-ACV)(1-戊酯前药)口服后迅速转化为阿昔洛韦[112]。阿昔洛韦由单纯疱疹病毒-1型(HSV-1)、HSV-2型和水痘-带状疱疹病毒(VZV)的胸苷激酶(TK)，以及人类巨细胞病毒(HCMV)的UL97激酶磷酸化。

表 113-4　抗疱疹病毒药物

抗病毒药物(缩写)	商标名(制药公司[a])	作用机制/给药途径	主要的不良反应	抗病毒活性
阿昔洛韦(ACV)	Zovirax(GSK)	由病毒激酶转变为单磷酸鸟嘌呤；由细胞激酶三磷酸化。DNA链终止子；口服或静脉制剂	毒性极低，胃肠道症状[b]，头痛，肾毒性；如果超过最大溶解度会造成肾小管沉积	单纯疱疹病毒-1型、-2型，水痘-带状疱疹病毒
缬-阿昔洛韦(Val-ACV)	Valtrex(GSK)	阿昔洛韦L-缬氨酸酯药物前体，可提高生物利用度；活性同阿昔洛韦	胃肠道症状、头痛、眩晕、腹痛、肾毒性、血栓性血小板减少症、溶血尿毒综合征(大剂量)	单纯疱疹病毒-1型、-2型，水痘-带状疱疹病毒，巨细胞病毒[c]
西多福韦(CDV)	Vistide(Gilead)	胞嘧啶核苷酸类似物；由细胞激酶转变为二磷酸或三磷酸产物；DNA链终止子(需要两个连续的分子)，与丙磺舒一起静脉注射	CDV：肾毒性、眼压降低、白细胞减少、发热；丙磺舒：头痛、胃肠道症状、皮疹	巨细胞病毒[d]，单纯疱疹病毒-1型、-2型，水痘-带状疱疹病毒
膦甲酸(FOS)	Foscavir(AstraZeneca)	焦磷酸类似物；DNA聚合酶焦磷酸结合位点的非竞争性抑制剂；只能静脉注射	肾损伤、发热、恶心、贫血、腹泻、呕吐、头痛、癫痫、电解质紊乱	巨细胞病毒[e]，单纯疱疹病毒-1型、-2型，EB病毒
更昔洛韦(GCV)	Cytovene(Roche)	鸟嘌呤类似物。由巨细胞病毒UL97激酶或单纯疱疹病毒或水痘-带状疱疹病毒的胸苷激酶转变成单磷酸形式；DNA链终止子；口服或静脉注射制剂	发热、白细胞减少、贫血、血小板减少、肾功能受损、腹泻	巨细胞病毒[e]，单纯疱疹病毒-1型、-2型
缬更昔洛韦(Val-GCV)	Valcyte(Roche)	口服GCV前体药物，提高生物利用度；活性同更昔洛韦	腹泻、白细胞减少、恶心、头痛、贫血	巨细胞病毒[e]
乐特莫韦	Prevymis(Merck)	巨细胞病毒终止酶复合物抑制剂	恶心、腹泻、呕吐、外周水肿、咳嗽、头痛、疲劳、腹痛	巨细胞病毒
喷昔洛韦(PCV)	Denavir(Novartis)	鸟嘌呤类似物；作用方式与阿昔洛韦类似；限制DNA链延伸；只有外用制剂	头痛、应用部位反应与安慰剂相同	单纯疱疹病毒-1型[f]
泛昔洛韦(FCV)	Famvir(Novartis)	喷昔洛韦的口服前体药物；作用方式同喷昔洛韦	头痛、胃肠道症状、厌食	单纯疱疹病毒-1型、-2型，水痘-带状疱疹病毒
曲氟尿苷	Viroptic(Monarch)	作用方式不清楚，可能抑制病毒DNA合成；外用眼药水	滴眼时烧灼感、眼睑水肿、角膜点状病变、变态反应、间质水肿、干燥性角膜炎、充血、眼压增高	单纯疱疹病毒-1型[g]
二十二烷醇	Abreva(GSK)	抑制单纯疱疹病毒包膜与细胞膜融合阻止病毒进入细胞；非处方外用软膏制剂	头痛和皮疹	口部单纯疱疹病毒

注：[a] 制药公司：阿斯利康(AstraZeneca)制药，威尔明顿，特拉华州；BMS，百时美施贵宝(Bristol-MeyersSquibb)，普林斯顿，新泽西州；吉利德(Gilead)科学公司，福斯特市，加利福尼亚州；葛兰素史克(GlaxoSmithKline)，研究三角公园，北卡罗来纳州；君王(Monarch)制药，布里斯托尔，田纳西州；诺华(Novartis)制药，东汉诺威，新泽西州；罗氏(Roche)制药，纳特利，新泽西州。[b] 胃肠道症状包括恶心、呕吐、腹泻。[c] 缬阿昔洛韦用于某些移植患者预防巨细胞病毒感染。[d] 据报道西多福韦也具有抗人类乳头瘤病毒、多瘤病毒、腺病毒和痘病毒的活性。[e] 更昔洛韦和缬更昔洛韦也具有抗EB病毒、人类疱疹病毒-6型、-7型和-8型的体外活性。[f] 喷昔洛韦被用于治疗唇疱疹，也具有抗单纯疱疹病毒-2型和水痘-带状疱疹病毒的活性。[g] 曲氟尿苷被用于治疗疱疹性角膜炎，也具有抗单纯疱疹病毒-2型和水痘-带状疱疹病毒的活性

阿昔洛韦以非活性代谢产物9-羧甲氧基甲基鸟嘌呤和8-羟基-9-(2-羟基乙氧基)甲基鸟嘌呤经肾脏排出。建议肾功能减低的患者调整剂量[112]。

(2)活性谱:阿昔洛韦和缬-阿昔洛韦具有抗HSV-1、HSV-2、水痘-带状疱疹病毒和EB病毒的活性[4]。值得注意的是,阿昔洛韦和缬-阿昔洛韦只针对正在复制的病毒。因此,它们在治疗主要由潜伏病毒引起的EB病毒相关疾病中的作用是有限的[114]。此外,2种药都有一些抗人类巨细胞病毒的活性。虽然不建议阿昔洛韦和缬-阿昔洛韦用于治疗人类巨细胞病毒,但已经预防性地用于某些移植后患者中以防止人类巨细胞病毒性疾病的发生[115-116]。

(3)药物相互作用:肾功能正常的患者未见临床明显的药物相互作用。

2. 西多福韦

(1)药理学:西多福韦(cidofovir,CDV)是一种单磷酸脱氧胞苷核苷酸类似物,不需要病毒编码酶激活。由细胞激酶磷酸化后,二磷酸西多福韦变为有活性的三磷酸核苷酸抑制人类巨细胞病毒DNA聚合酶。在人类巨细胞病毒中,2个连续的西多福韦分子必须组合起来完成链的终止[117]。西多福韦必须与丙磺舒合用[118-119]。几乎90%使用剂量的西多福韦24 h内以原型形式从尿中排出。该药半衰期为2.4～3.2 h。当西多福韦与丙磺舒合用时,西多福韦的肾清除率降低到与肌酐清除率一致的水平,这说明丙磺舒阻碍了肾小管主动分泌西多福韦[118]。在体外,不到6%的西多福韦与血浆或血清蛋白结合。

(2)活性谱:西多福韦可有效对抗几种疱疹病毒包括人类巨细胞病毒、单纯疱疹病毒和水痘-带状疱疹病毒[4]。西多福韦也具有抗痘病毒类[120]、腺病毒[121]、多瘤病毒[122]和人乳头瘤病毒[123-124]的活性。

(3)药物相互作用:西多福韦有临床意义的药物相互作用尚未确定。然而,西多福韦与丙磺舒合用可能因潜在阻断肾的酸性药物转运而产生药物相互作用[118]。

3. 膦甲酸

(1)药理学:膦甲酸(fascarnet,FOS)的药代动力学数据提示其代谢微乎其微,意味着该药通过血液循环分布广泛并通过肾排出。然而,现有数据表明在患者人群和个体中该药的药代动力学是不同的,尤其是考虑到血浆膦甲酸的水平[125]。膦甲酸通过泌尿排泄的最终半衰期为(87.5±41.8) h,可能是由于该药从骨骼中释放出来[126]。约90%的膦甲酸以原型由尿排出。随肾功能的下降膦甲酸的系统清除率降低并且半衰期延长,因此可能需要调整剂量[127]。

(2)活性谱:虽然膦甲酸具有抗包括单纯疱疹病毒、巨细胞病毒、水痘-带状疱疹病毒和EB病毒等多种疱疹病毒的活性,但它最常用于治疗耐药的单纯疱疹病毒和巨细胞病毒。

(3)药物相互作用:因为有报道称膦甲酸能降低血清中钙离子的浓度,所以谨慎建议患者接受已知会影响血中钙离子水平的药物,如静脉注射喷他脒。肾脏受损是膦甲酸主要的不良反应,因此,应避免膦甲酸与其他有潜在肾毒性的药物合用,如氨基糖苷类、两性霉素B[128]。

4. 更昔洛韦和缬-更昔洛韦

(1)药理学:更昔洛韦(ganciclovir,GCV)是具有2′-脱氧鸟苷的非环状核苷类似物,需要经过病毒的激酶磷酸化产生活性。单磷酸更昔洛韦通过细胞激酶进行一连串的磷酸化变为二磷酸和三磷酸形式[1,4]。

缬更昔洛韦(val-GCV)是更昔洛韦的L-缬氨酸酯药物前体,口服后迅速转变为更昔洛韦[129]。缬-更昔洛韦的生物利用度为60.9%,而更昔洛韦的口服制剂为5.6%。更昔洛韦的半衰期在健康人群中为4 h,而在移植受者中为6.5 h[130-131]。仅有1%～2%更昔洛韦与蛋白结合。通过肾小球滤过以原型药物经肾排出并且肾小管主动分泌是更昔洛韦的主要排泄途径(91%)。

(2)活性谱:更昔洛韦对人类巨细胞病毒及单纯疱疹病毒-1型、单纯疱疹病毒-2型、水痘-带状疱疹病毒、EB病毒、人类疱疹病毒-6型、人类疱疹病毒-7型和人类疱疹病毒-8型都有作用[132-135]。

(3)药物相互作用:更昔洛韦与去羟肌苷合用能显著增加去羟肌苷的水平[133]。由于更昔洛韦和齐多夫定有相同的粒细胞减少和贫血等血液方面的不良反应,两者合用时均需调整剂量。抑制肾小管分泌的药物,如丙磺舒,也可能需要调整剂量。亚胺培南-西斯他汀不应与更昔洛韦合用[133]。

5. 莱特莫韦

(1)药理学:莱特莫韦(letermovir)通过抑制末端酶复合物(pUL51、pUL56和pUL89)阻止人

巨细胞病毒复制，从而导致无法切割连接的基因组病毒 DNA，也无法将基因组导入预先形成的病毒衣壳。具有口服生物利用度，半衰期为 12 h。主要经粪便排泄。在一项针对 HCMV 血清阳性的造血干细胞移植受者的Ⅲ期双盲试验中，对莱特莫韦在移植后第 24 周预防活动性 HCMV 感染方面的功效与安慰剂进行了比较[152]。该试验发现，服用莱特莫韦的患者中有 37.5%发生了 CMV 感染，而安慰剂组为 60.6%。活动性 HCMV 感染的大多数病例是无症状 DNA 血症。HCMV 疾病罕见，两组不良反应相似，骨髓毒性和肾毒性事件相似。基于这项研究的结果使 FDA 于 2017 年批准了莱特莫韦的使用。

（2）活性谱：莱特莫韦仅对 HCMV 有抗病毒活性，对其他疱疹病毒（包括 HSV 和 VZV）无效。

（3）药物相互作用：莱特莫韦高度结合蛋白质，在肝中代谢。它是一种 P-糖蛋白和 CYP3A4 的抑制剂，可以增加氨氯地平、阿托伐他汀、西洛他唑、环孢菌素和依鲁替尼的血清浓度。

6. 喷昔洛韦和泛昔洛韦

（1）药理学：泛昔洛韦（famciclovir，FCV）是一种口服前体药物，它是喷昔洛韦（Penciclovir，PCV）[136]的二乙酰 6-脱氧类似物，很快转化为活性成分喷昔洛韦[137]。治疗局部唇疱疹只有一种 1% 的喷昔洛韦乳膏[138]。喷昔洛韦的生物利用度为 77%，半衰期为 2 h。可随餐或空腹给药。低于 20% 的喷昔洛韦与蛋白结合并且经尿（73%）和粪便（27%）排出[139]。虽然喷昔洛韦与阿昔洛韦结构接近，但它比阿昔洛韦与单纯疱疹病毒胸苷激酶的亲和力更高。然而，三磷酸阿昔洛韦比三磷酸喷昔洛韦对单纯疱疹病毒 DNA 聚合酶的亲和力要高。因此，这 2 种药物有相似的抗单纯疱疹病毒的能力[140]。

（2）活性谱：喷昔洛韦和泛昔洛韦有抗单纯疱疹病毒-1 型、单纯疱疹病毒-2 型和水痘-带状疱疹的活性[141]。这 2 种化合物对其他人类疱疹病毒都不起作用。

（3）药物相互作用：喷昔洛韦没有明显的临床药物相互作用。

7. 曲氟尿苷

（1）药理学：曲氟尿苷（trifluridine）是一种氟嘧啶核苷，被批准用于局部治疗由单纯疱疹病毒引起的上皮性角膜炎[142]。该药具有抗单纯疱疹病毒-1 型、单纯疱疹病毒-2 型和痘状病毒的活性[143]。曲氟尿苷滴眼后在眼内渗透。

角膜完整性欠缺或基底及色素层炎症可能增强曲氟尿苷渗透进入房水。曲氟尿苷治疗剂量的机体吸收量可忽略不计[144]。

（2）药物相互作用：尚未有关于局部用药产生药物相互作用的报道。

8. 正二十二烷醇

（1）药理学：正二十二烷醇（n-docosanol）在体外具有抗多种脂质包膜病毒的活性，包括单纯疱疹病毒-1 型、单纯疱疹病毒-2 型和呼吸道合胞病毒[145]。正二十二烷醇的外用制剂是一种用来治疗唇疱疹的市售非处方 10% 软膏。

（2）药物相互作用：局部用药未见有关药物相互作用的报道。

9. 其他抗疱疹病毒的药物 有几种抗病毒药物正在进行临床试验，或被批准用于抗病毒治疗以外的情况。马立巴韦（maribavir）是一种苯并咪唑类的抗病毒新药[146]。马立巴韦不会被 UL97 激酶磷酸化，但会直接抑制 UL97 激酶的活性。已发现它在体外对 HCMV 的 GCV 耐药菌株有效，唯一的不良反应是味觉障碍[147]。不幸的是，在干细胞移植和肝移植受者巨细胞病毒感染疾病的Ⅲ期临床试验发现马立巴韦不足以预防巨细胞病毒疾病[148-149]。但是，已经启动了新的临床试验来验证缺乏疗效可能是由于剂量不足造成（https://clinicaltrials.gov;NCT02927067 和 NCT02931539）。

brincidofovir 是 CDV 的口服脂质偶联物[150]。它具有抗所有疱疹病毒活性，包括抗 GCV 的 CMV 和抗 ACV 的 HSV 及多瘤病毒、痘病毒和腺病毒[151]。但是，严重的腹泻和死亡率增加导致Ⅲ期试验失败（https://clinicaltrials。gov; NCT01769170）。新制剂可能会引导启动针对目标患者治疗的试验。

2 种 helicase/primase 抑制剂 pritelivir 和 amemevir 在Ⅱ期研究中已显示出其抗病毒疗效[153,154]。pritelivir 和 amenamevir 表现出针对 HSV-1 和 HSV-2 的活性，而 amenamevir 还表现出针对 VZV 的活性。

据报道，另外 2 种用于其他医疗方面的药物也具有抗人类巨细胞病毒的活性，尽管还没有进行临床试验。这 2 种药物是被批准用于治疗类风湿关节炎[155-156]的来氟米特和抗疟药物青蒿酯[157-158]。

五、抗流感病毒药物

2 类用于治疗流感的抗病毒药物为 M2 蛋白抑制剂和神经氨酸酶抑制剂[159-161]。每种药的结构、作用方式、给药途径和不良反应总结于表 113-5。疾病预防控制中心网站上有使用这些抗病毒药物预防和治疗流感的建议（http://www.cdc.gov/flu）。

表 113-5 抗流感病毒药物

抗病毒药物	商标名(制药公司[a])	作用机制/给药途径	主要的不良反应
金刚烷胺/金刚烷乙胺	Symmetrel/Flumadine（Endo/Forrest）	通过干扰病毒 M2 蛋白阻止核酸释放；口服	中枢神经系统症状[b]、胃肠道症状[c]
奥司他韦	Tamiflu(Genentech)[Gilead (licensor)]	唾液酸类似物；神经氨酸酶竞争抑制剂，影响流感病毒颗粒从宿主细胞中释放；口服	胃肠道症状[c]（通常较轻）、短暂精神症状[d]
帕拉米韦	Rapivab(Biocryst)	同奥司他韦；静脉注射	胃肠道症状[c]、白细胞减少/中性粒细胞减少
扎那米韦	Relenza(GSK)	同奥司他韦；口腔雾化吸入	雾化吸入后，呼吸功能降低

注：[a] 制药公司：生物水晶(Biocryst)制药，达勒姆，北卡罗来纳州；恩多(Endo)制药，查兹福德，宾夕法尼亚州；森林(Forest)公司，圣路易斯，密苏里州；罗氏(Roche)制药，纳特利，新泽西州；吉利德(Gilead)科学公司，福斯特市，加利福尼亚州；葛兰素史克(GlaxoSmithKline)，研究三角公园，北卡罗来纳州。[b] 中枢神经系统症状包括混乱、焦虑、失眠、注意力不集中、眩晕、幻觉、癫痫。[c] 胃肠道症状包括恶心、呕吐和厌食。[d] 精神症状包括自我伤害和谵妄

(一)M2 蛋白抑制剂

病毒编码的 M2 蛋白有利于内体中氢离子介导的基质蛋白-核糖核蛋白（ribonucleoprotein，RNP）复合体解离，并将 RNP 释放入宿主细胞的胞质中。M2 抑制剂阻断 H^+ 离子通过 M2 离子通道，从而阻止病毒脱壳[1,162-163]。

金刚烷胺和金刚烷乙胺：金刚烷类的代谢和不良反应各种各样，但是它们具有相似的抗甲型流感病毒的活性。2 种药物都不具有抗乙型流感病毒的活性。最近报道表明，季节性流感病毒 H3N2 和近期大流行的 H1N1 病毒对 2 种药物都有较高的耐药发生率[1,164-165]。因此，不再推荐金刚烷类用于流感的预防和经验性治疗。

(二)神经氨酸酶抑制剂

流感病毒神经氨酸酶（neuraminidase，NA）是一种包膜蛋白可水解唾液酸末端残基，将病毒颗粒从感染的细胞中释放出来。病毒编码的神经氨酸酶使流感病毒在细胞间传播。3 种神经氨酸酶抑制剂（neuraminidase inhibitors，NAIs）被批准用于治疗甲型和乙型流感病毒：奥司他韦、扎那米韦和帕拉米韦[166-167]。其中，奥司他韦使用最为广泛。在 2007—2008 年，一种高比例的季节性 H1N1 流感病毒分离株由于一个氨基酸被取代造成了对奥司他韦耐药，但它们仍然对扎那米韦敏感[164,168]。但在 2013－2014 年度，据美国疾病预防控制中心(CDC)报道，2009 年 H1N1 大流行病毒株中 98.2%对奥司他韦敏感，100%对扎那米韦敏感（https//www.cdc.gov/flu/about/qa/antiviralresistance.htm）。

1. 奥司他韦

(1)药理学：磷酸奥司他韦是一种乙酯前体药物，需要酯解转化为活性形式羧酸盐奥司他韦。口服后，磷酸盐奥司他韦在胃肠道中迅速吸收并且主要在肝酯酶的作用下最大限度地转变为羧酸盐奥司他韦[169]。至少 75% 的口服剂量以羧酸盐奥司他韦的形式进入体循环。羧酸盐奥司他韦的血浆结合率低。血浆半衰期为 6～10 h。随餐服用不良反应较少。羧酸盐奥司他韦不会进一步代谢并且经尿排出[170]。奥司他韦预防自然发生的流感疾病的有效性已经被治疗和预防试验所证实[171-173]。

(2)药物相互作用：奥司他韦的研究结果表明不太可能发生具有临床意义的药物相互作用，因为无论该药还是其代谢产物羧酸盐奥司他韦都不

是葡萄糖醛酸转移酶所需的 CYP450 同工酶的底物。与其他通过相同途径排泄的药物可能会存在药物相互作用，如丙磺舒通过尿排出体外[170]。活流感疫苗注射前 2 周和注射后 48 h 内不应服用奥司他韦。

2. 帕拉米韦

(1)药理学：帕拉米韦(peramivir)于 2014 年末被批准用于治疗无合并症的流感。帕拉米韦口服生物利用度较低，因此只有注射剂。该药基本上经肾排出[174]。

(2)药物相互作用：无明显的药物相互作用[174]。

3. 扎那米韦 扎那米韦(zanamivir)用于降低成人自然发生的无合并症的流感疾病的严重程度和病程[175]。扎那米韦只通过泡囊包装的吸入剂经呼吸道给药[176]。该药使用时通过一种特殊设计的呼吸驱动的塑料装置吸入每个泡囊里面的药粉。这种方式可快速为给药部位提供很高的局部药物浓度。由于经呼吸道给药，扎那米韦禁止用于伴有呼吸道基础疾病如哮喘的患者。如前文所提到，已经对奥司他韦耐药的 H1N1 株仍然对扎那米韦敏感。

(1)药理学：扎那米韦完全口服的生物利用度极低，只有 2%。经鼻内或口腔吸入后，机体吸收量平均为 10%～20%，通常 1～2 h 后达到最大血药浓度。剩余的 70%～80% 留在口咽部位并经粪便排出。平均血浆半衰期范围为 2.5～5.5 h，机体吸收的药物以原型经尿排出体外。吸入后药物低水平的吸收导致其血浆浓度很低，仅有部分扎那米韦分布于全身[170]。

(2)药物相互作用：扎那米韦无法被代谢，因此，很少有潜在的药物相互作用[177]。

参考文献请扫二维码查阅

第 114 章　抗病毒药物耐药机制

ROBERT W. SHAFER, GUY BOIVIN, SUNWEN CHOU

（韩晓旭　译；邹明祥、钱渊　审校）

了解病毒耐药机制对于正在接受抗病毒治疗个体的临床管理、新的抗病毒药物的研发及耐药性监测都至关重要。本章对用于治疗 7 种常见病毒感染的抗病毒药物的耐药机制进行了综述，分别是单纯疱疹病毒（herpes simplex virus，HSV）、巨细胞病毒（cytomegalo-virus，CMV）、水痘-带状疱疹病毒（varicella-zoster virus，VZV）、人类免疫缺陷病毒 1 型（human immunodeficiency virus type 1，HIV-1）、甲型和乙型流感病毒、乙型肝炎病毒（hepatitis B，HBV）和丙型肝炎病毒（hepatitis C，HCV）。

抗病毒药物耐药最常见的是由治疗药物的分子靶标发生突变所介导的。耐药性发生是表明抗病毒药物通过特异性抑制病毒，而非其宿主细胞来发挥作用的最有说服力的证据。耐药的病毒亚群可能以低水平存在于临床分离株中，或仅在暴露于药物的情况下才可能出现。RNA 病毒聚合酶工作时容易出错，导致 RNA 病毒比 DNA 病毒更容易产生耐药性。

通过体外传代试验可鉴定耐药性病毒，即在浓度逐步升高的抑制性药物中培养野生型病毒株，以及体外分析来自接受抗病毒治疗患者的病毒分离株。药物敏感性测定是通过将固定量的病毒接种在连续稀释的抑制性药物中共培养的方法。测量敏感性的最常用指标是抑制 50%病毒复制的药物水平，即 EC_{50}。药物敏感性试验并不是用来确定抑制病毒在体内复制所需的药物浓度，而是鉴定与野生型病毒相比药物敏感性降低的病毒株。通过研究携带药物敏感性降低毒株患者的治疗反应，可以明确药物敏感性降低的临床意义。

在过去的 20 年间，病毒出现耐药的基本方式之一，是通过病毒自身产生主要耐药突变（major mutations）降低病毒对药物的敏感性，一些主要耐药突变可引起病毒适应性下降，病毒常通过辅助耐药突变（accessory mutations）来补偿下降的适应性。但也有少数值得注意的例外情况，即在未接受抗病毒治疗的患者中，并不会出现主要耐药突变，但辅助耐药突变往往会以多态性的形式存在。

随着用于治疗慢性病毒感染的抗病毒药物的成功开发，以及对一系列急性病毒感染构成威胁认识的逐步加深，人们近年来开发了多种新的处于临床试验阶段的抗病毒化合物。其中一些正进入Ⅱ期和Ⅲ期临床试验，并可能最终被批准用于治疗人类流感病毒、严重呼吸道合胞病毒感染和一些高发病率和（或）死亡率的地方流行性病毒[1-4]。令人感兴趣的是，与目前被批准使用的大多数抗病毒药物不同的是，一些化合物似乎具有广谱的抗病毒活性。例如，作为一种被重新调整用途的抗寄生虫化合物，硝唑尼特（nitazoxanide）似乎既具有广谱抗病毒活性又有免疫调节活性，已经在一项Ⅱ期临床试验中表现出抗流感活性[5-6]。作为 RNA 依赖的 RNA 聚合酶的抑制剂，法匹拉韦（favipiravir）和 GS-5734 对于几种 RNA 病毒似乎也有抗病毒活性[7,8]。然而，由于大多数在研的抗病毒药至少还需要几年的时间才有获得 FDA 批准使用的可能性，并且目前对它们的耐药机制知之甚少，因此本章不对其进行综述。

一、疱疹病毒

目前，所有获 FDA 批准用于治疗疱疹病毒感染的药物均以病毒 DNA 聚合酶为靶点（表 114-1）。初始治疗的优选方案为核苷类似物类，此类

药物可被病毒编码的酶选择性磷酸化。前体药物经代谢变成原型药物，提高了药物口服生物利用度。阿昔洛韦(acyclovir，ACV)的前体药物伐昔洛韦(valacyclovir)与喷昔洛韦(penciclovir，PCV)的前体药物泛昔洛韦(famciclovir)已经成功用于生殖器单纯疱疹病毒(gential herpes simplex virus，HSV)感染、水痘-带状疱疹病毒感染及免疫力不全患者的皮肤黏膜疱疹病毒感染的治疗。更昔洛韦(ganciclovir，GCV)及其前体药物缬更昔洛韦(valganciclovir)用于 CMV 感染治疗。除了上述鸟苷酸类似物类抗病毒药物以外，还有一些不依赖病毒酶预先激活的抗病毒药物，如焦磷酸类似物膦甲酸(phosphonoformate，FOS)及胞嘧啶核苷酸类似物西多福韦(cidofovir，CDV)。当初始治疗无效时，FOS 和 CDV 通常作为二线和三线药物使用。莱特莫韦(letermovir)作为一种口服的人类巨细胞病毒末端酶抑制剂，用于预防造血干细胞移植后出现临床重要的 CMV 感染，最近成功通过了Ⅲ期临床试验(ClinicalTrial. gov 标识号 NCT02137772)。另一种药物马立巴韦(maribavi)，作为巨细胞病毒 UL97 激酶的口服抑制剂，却没有成功通过类似的预防 CMV 感染的Ⅲ期临床试验(NCT00411645)，但据报道，在后续的对移植受体耐药或难治性 CMV 感染治疗的Ⅱ期试验中，报告应用更高剂量马立巴韦有效(NCT01611974)，因此启动了Ⅲ期治疗试验(NCT02931539)。

表 114-1 疱疹病毒耐药相关机制及突变

病毒	抗病毒药物	耐药机制	耐药突变
HSV	阿昔洛韦 伐昔洛韦 喷昔洛韦 泛昔洛韦	胸苷激酶(TK，*UL23*)和(或)DNA 聚合酶(*UL30*)突变	TK 移码(常出现在一连串的 G 或 C 碱基上)或者是引起 TK 缺陷表型的替换突变，对 4 种药物产生交叉耐药。在较少见的情况下，TK 突变改变底物的特异性，或者聚集在手掌和手指区域的 DNA 聚合酶突变
	膦甲酸钠	DNA 聚合酶(*UL30*)突变	在Ⅱ、Ⅵ和Ⅲ区出现成簇的突变(可能是焦磷酸结合区)
	西多福韦	DNA 聚合酶(*UL30*)突变	在核酸外切酶区及Ⅱ、Ⅲ和Ⅴ保守区出现突变(根据实验室病毒株得到的有限数据)
VZV	阿昔洛韦 伐昔洛韦 喷昔洛韦 泛昔洛韦	TK(*ORF36*)和(或)DNA 聚合酶(*ORF28*)突变	TK 移码或替换突变导致 TK 缺陷的表型，对 4 种药物产生交叉耐药，TK 选择性突变及 DNA 聚合酶突变较少见
	膦甲酸钠	DNA 聚合酶(*ORF28*)突变	在Ⅱ、Ⅵ及Ⅲ区(可能是焦磷酸结合区)成簇出现的突变
	西多福韦	DNA 聚合酶(*ORF28*)突变	无 VZV 特异性耐药数据
CMV	更昔洛韦	UL97 激酶突变和(或)DNA 聚合酶(*UL54*)突变	*UL97* 突变通常发生在 460、520 及 590-607 位残基上，最常见的突变类型为 M460V/I、H520Q、C592G、A594V、L595S 及 C603W。DNA 聚合酶突变不太常见(主要在核酸外切酶区及Ⅴ区，如 408 位、412 位、522 位、545 位及 987 位残基)，这些突变通常在已有 *UL97* 突变的基础上出现
	膦甲酸钠	DNA 聚合酶(*UL54*)突变	在聚合酶催化结构域的突变与焦磷酸结合及核苷酸的识别(成簇分布于Ⅱ区、Ⅵ区及Ⅲ区内或其间，如 700、715、756、781、802 和 809 位残基)有关，有些突变还会降低更昔洛韦±西多福韦的敏感性
	西多福韦	DNA 聚合酶(*UL54*)突变	发生在核酸外切酶区和Ⅴ区，会引起更昔洛韦交叉耐药。在Ⅲ区一些与膦甲酸钠相关的突变有低度交叉耐药
	莱特莫韦	末端酶基因突变(*UL56*、*UL89*、*UL51*)突变	*UL56* 突变通常发生在 231-261，325 或 369 位残基上；*C325* 的突变产生了完全耐药性；在细胞培养中观察了罕见的 *UL89* 和 *UL51* 基因突变
	马立巴韦	*UL97* 和(或)*UL27* 基因突变	ATP 结合区域的 *UL97* 突变(密码子 335～480 位)，一般为 T409M 和 H411Y/N；不同的 UL27 突变会导致临界的或轻度的敏感性降低

(一)单纯疱疹病毒

ACV 和 PCV 首先被 HSV 胸苷激酶(thymidinekinase,TK)单磷酸化,然后被细胞酶转化成三磷酸盐。ACV 的三磷酸盐导致 DNA 复制链终止并形成一种可强烈抑制病毒 DNA 聚合酶的末端复合物[9]。与 ACV 相比,PCV 三磷酸盐在感染细胞里浓度更高,存在时间更长,但对病毒 DNA 聚合酶的抑制作用较低[10]。由于病毒胸苷激酶并非 HSV 复制所必需的,多种 TK 突变可能降低核苷酸类似物的磷酸化,这也是迄今为止 ACV 和 PCV 最常见的耐药机制[11-12]。TK 突变不会引起与病毒介导磷酸化过程无关药物的交叉耐药(包括 FOS 和 CDV)。

TK 耐药突变分为缺失性 TK(TK-negative)突变、低活性 TK(TK-low)突变及选择性 TK(TK-altered)突变。缺失性 TK 突变是移码突变或终止突变导致重要功能域缺失所引起的;低活性 TK 突变是指某些突变可减少对天然核苷酸及抗病毒药物的磷酸化[11-14];选择性 TK 突变是指这种突变选择性降低对某些抗病毒核苷类似物的磷酸化,但这种突变类型较为少见。尽管由 PCV 与 ACV 选择出的突变不同,也可能会出现交叉耐药[12-15]。临床病毒分离株中,在同聚性 TK 基因位点(如连续多个 G 碱基的位点)上出现碱基插入或缺失的移码性突变的情况最为常见[14]。在某些保守区上,TK 氨基酸替换会产生耐药簇,如 ATP 与核苷酸结合位点(氨基酸残基 51～63 和 168～176),许多其他的取代则代表了基线多态性,往往涉及非保守残基[12]。特定突变对 TK 活性及药物敏感性的影响,可通过对照病毒株定点突变来确定,这有助于丰富数据库[12]。此外,在一些个体内,多种混合存在的耐药基因型毒株还会发生进化[16-17]。上述因素使 HSV 耐药基因型诊断十分复杂,因此目前表型检测仍是常用方法[11-12]。

HSV 缺失性 TK 突变株在老鼠模型中是减毒株,其毒力、潜伏及再激活的潜力都下降[18]。但动物研究[19]和临床病例报告[20-21]显示,耐药病毒株可引起明显的疾病及复发性感染。甚至一些因存在移码突变而预测为缺失性 TK 的毒株,也可能通过诸如核糖体移码等机制[22],表现出一些 TK 活性,使病毒从潜伏状态再激活[19]。尽管 HSV 的 TK 耐药突变株很容易地通过细胞培养筛选出来,但临床上,ACV 耐药的 HSV 病毒株的分离频率在免疫功能正常的宿主中低于 1%,在免疫功能不全的宿主中介于 7%～16%[23-24]。造血细胞移植受者是高危人群[24],最近的一项前瞻性研究发现,在预防应用 ACV 期间 28% 的患者因耐药而发生病毒突破感染[25]。而在 173 例患有角膜炎的免疫功能正常患者中,有 11 例(6.4%)检测到了 ACV 耐药株[26],原因可能是病毒躲避了宿主正常的免疫防御而持续性感染或再次激活,其中就包括病毒耐药株[13,17]。

DNA 聚合酶(*pol*)突变有时也会使 HSV 对 ACV、PCV、FOS 和 CDV 产生耐药[12,14,17]。因为 DNA 聚合酶是病毒复制必不可少的基因,突变更具有选择性而且通常会在酶功能区发生单一氨基酸突变。ACV 的耐药突变分布在几个 *pol* 区的保守区域,在手掌和手指结构域成簇分布[12,27],常常与 FOS 交叉耐药。与 GCV 和 CMV 不同的是,*pol* 区的核酸外切酶结构域中没有耐药突变的聚集。在临床分离株中关于 CDV 的耐药突变范围了解甚少,但已有数据表明,CDV 与 ACV 或 FOS 很少存在交叉耐药[11-13]。

(二)水痘-带状疱疹病毒

VZV 感染通常以口服前体药物伐昔洛韦或泛昔洛韦,或静脉注射 ACV 进行治疗。正常个体中很少出现耐药性,然而,免疫功能不全的个体感染后可出现持续感染及反复感染,并且在广泛的抗病毒治疗后,出现耐药的风险会增加[11,28-29]。

VZV 耐药机制与 HSV 类似。大多数 ACV 耐药的 VZV 含有 *TK* 基因突变,导致 TK 缺陷或改变底物的特异性。突变包括终止、移码及替换突变[11]。因为与 HSV 相比,VZV 临床分离株的表型耐药检测更加有限,检测上述突变可用于基因型耐药检测。尽管 VZV 的 TK 多态性比 HSV 少[30],但由于对一些氨基酸替换突变的意义不清,影响了对检测结果的解释。由于 FOS 和 CDV 的抗病毒活性不依赖于 TK,对于 ACV 耐药的 VZV,可以选择 FOS 及 CDV 作为替代方案。较少见的是,ACV 的耐药性可能是由聚集在 VZV DNA 聚合酶手掌和手指结构域的突变族引起的,其中一些突变会引起对 FOS 的交叉耐药[27]。

(三)巨细胞病毒

CMV 无 TK,但有 *UL97* 基因编码的另一激

酶。在细胞培养中，该激酶是病毒高效复制所必需的，也是抗病毒药物的潜在靶点[31]。GCV 是 CMV 感染的标准初始治疗药物，其被 UL97 激酶单磷酸化后，在被感染的细胞中转化成具有活性的三磷酸盐形式[32]。CMV 耐药的危险因素是病毒持续复制（如在免疫功能低下的患者中）再加上长期暴露于抗病毒药物，通常达数月[33]。CMV 耐药基因型检测是临床标准的检测方法，因临床分离株无法及时进行表型耐药检测。一个经重组表型[34-36]验证的耐药突变大数据库为制定操作指南奠定了基础[37]。

90%以上 GCV 耐药的 CMV 含有 *UL97* 突变，该突变被证实或推测可能通过相对保留生物激酶功能影响 GCV 的磷酸化[32]。在抗 GCV 的 CMV 分离毒株中，*UL97* 突变常位于 460、520 及 590～607 位密码子上，7 个最常见的突变为 M460V/I、H520Q、C592G、A594V、L595S 及 C603W[36]。除了 C592G 可导致对 GCV 3 倍耐药外，其余突变均可导致对 GCV 的 5～10 倍耐药。许多其他点突变及缺失突变可引起 GCV 不同程度耐药，主要发生在 590～607 位氨基酸密码子[38]。尚不清楚 *UL97* 突变是否参与了 FOS 或 CDV 耐药。

长时间暴露于 GCV 后可选择出 UL54 DNA 聚合酶（*pol*）基因的突变。尽管 *pol* 基因突变本身通常引起低度耐药（2～5 倍），但这种突变通常出现在已有 UL97 基因突变基础上，引起整体耐药水平提高[39-40]。少数情况下，*pol* 基因突变可能是发生 GCV 耐药的初始标记[36]。GCV 耐药的 *pol* 基因突变可能引起其他药物交叉耐药。有报道称 GCV 及 CDV 显著耐药突变（高达 20 倍）位点位于 *pol* 基因 301、408～413、501～545（对应核酸外切酶）及 978～988 位（Ⅴ区）密码子，其中 A987G 最令人关注[36]。GCV 三磷酸盐和另一个核苷酸结合后通常会发生聚合酶的停滞，而核酸外切酶突变会避开这种停滞[41]。

FOS 耐药突变常位于氨基末端，CMV DNA 聚合酶的手掌结构域及手指结构域（552-982 位密码子）[34-36]。大多数 FOS 耐药突变可引起 EC_{50} 值提高 2～5 倍，并且常常导致病毒的适应性降低。针对 FOS 的耐药突变（尤其是发生在拇指结构的突变）可引起 GCV±CDV 低度交叉耐药[36]，此类交叉耐药可能涉及一些与识别引入三磷酸核苷，以及焦磷酸交换功能有关的聚合酶残基。少数情况下，*pol* 基因的单一突变（如 A834P 或 981-2 缺失）足以引起针对 GCV、CDV 及 FOS 3 种药物耐药[34-36]。尽管已有一个相当庞大的基线序列多态性及表型突变的数据库支持，仍有许多 *pol* 基因变异的耐药相关性不清楚，需要通过重组表型试验明确其意义[42]。

莱特莫韦（letermovir）耐药突变主要与 CMV 末端酶复合物的 UL56 成分有关。目前获得的信息大多来源于体外选择试验（in vitro selection experiments）[43-44]，在这些试验中，大量 *UL56* 突变发生在 229-369 位残基上，并且这些突变会导致不同程度的耐药性。完全耐药（EC_{50} 增加 3000 倍，接近于产生细胞毒作用的浓度）通常是由 325 位密码子的单步突变导致的氨基酸取代，如：C325F/R/Y[43-44]，也可由其他突变的组合产生。C325 突变体在体外仍保持接近正常的生长适应性[43-44]。在临床上，使用莱特莫韦所产生的突变频率和分布仍未确定。临床试验报告的第一例为 UL56 V236M[45]，该突变使 EC_{50} 增加了 30～45 倍。

马立巴韦暴露后产生的耐药突变位于 UL97 激酶药物靶点与 ATP 的结合位点[46]。在体外试验和受治疗对象中最常见的突变是 T409M（导致 EC_{50} 增加 80 倍）和 H411N/Y（导致 EC_{50} 增加 9～12 倍）[46-48]。这些 *UL97* 突变不会产生 GCV 交叉耐药[46]，但据报道，p-环内 342 密码子的突变在不破坏 UL97 激酶活性的情况下，会产生马立巴韦和 GCV 的双重耐药[49]。单独基因 *UL27* 上不同的突变可能导致马立巴韦低度耐药[50]，可能是通过一种影响抗病毒活性的方式调节宿主细胞代谢[51]。

二、人类免疫缺陷病毒

在约 30 种已获 FDA 批准使用的抗逆转录病毒（antiretroviral，ARV）药物中，最常用的包括以下几种。①6 种核苷逆转录酶抑制剂（nucleoside reverse transcriptase inhibitors，NRTIs）。胞嘧啶类似物：拉米夫定（lamivudine）和恩曲他滨（emtricitabine）；替诺福韦前体药物：富马酸替诺福韦酯（tenofovir disoproxil fumarate）和替诺福韦艾拉酚胺（tenofovir alafenamide），以及阿巴卡韦（abacavir）和齐多夫定（zidovudine）。②3 种非核苷逆转录酶抑制剂（nonnucleoside RT inhibitors，NNRTIs）：依非韦

伦(efavirenz)、利匹韦林(rilpivirine)、依曲韦林(etravirine);③ 3 种药理学加强的蛋白酶抑制剂(protease inhibitors,PIs):利托那韦配伍的洛匹那韦(lopinavir)、利托那韦(ritonavir)或可比司他(cobicistat)(CYP4503A 抑制剂)配伍的阿扎那韦(atazanavir)、利托那韦或比考司他配伍达芦那韦(darunavir);④4 种整合酶抑制剂(integrase inhibitors,INIs),也称为整合酶链转移抑制剂(integrase strand transfer inhibitors,INSTIs):拉替拉韦(raltegravir)、埃替拉韦(elvitegravir)、度鲁特韦(dolutegravir)及比卡格韦(bictegravir)。此外,2 种获批的融合抑制剂:恩夫韦肽(enfuvirtide),以及 CCR5 抑制剂:马拉韦罗(maraviroc)只能用于一些特定的临床情况(表 114-2)。由于富马酸替诺福韦酯和替诺福韦艾拉酚胺具有相似的耐药谱,则两者统称为替诺福韦。虽然替诺福韦艾拉酚胺在细胞内的水平高于富马酸替诺福韦酯,但目前还没有研究证明其在耐替诺福韦毒株中有更高的活性。图 114-1 描述了 HIV-1 复制周期中每类 ARV 药物的作用步骤。

表 114-2 抗逆转录病毒药物耐药的遗传机制

药物种类	机制	耐药突变位点[a]
核苷/核苷酸逆转录酶抑制剂[b](NRTIs)	①突变使病毒 RT 可分辨 NRTIs 和细胞核苷三磷酸	阿巴卡韦(ABC):K65R/N,K70E/Q/G,L74V/I,M184V/I;多种 TAM 包括 T215Y/F;MDR 突变
	②突变促进 ATP 依赖的水解移除链终止的单磷酸核苷酸,也称 TAMs	恩曲他滨(FTC)和拉米夫定(3TC):M184V/I>>K65R/N>>MDR 突变
		替诺福韦(TDF)和替诺福韦艾拉酚胺(TAF):K65R/N、K70E/Q/G、Y115F;多种 TAM,包括 T215Y/F;MDR 突变
		齐多夫定(AZT,ZDV):TAMs,MDR 突变
非核苷类逆转录酶抑制剂(NNRTIs)	突变位于 RT 的 NNRTI 结合口袋区,干扰抑制剂结合	奈韦拉平(NVP):K101E/P、K103N/S、V106A/M、Y181C/I/V、Y188L/C/H、G190A/S/E/Q、F227L/C、M230L
		依非韦伦(EFV):L100I、K101E/P、K103N/S、V106A/M、Y188L/C/H、G190A/S/E/Q、P225H、F227C、M230L
		依曲韦林(ETR):L100I、K101E/P、Y181C/I/V、G190E/Q、F227C 和 M230L
		利匹韦林(RPV):L100I、K101E/P、E138A/G/K/Q/R、Y181C/I/V、Y188L、G190E/Q、F227C 和 M230L
		辅助耐药突变:A98G、K101H、V108I、V179D/E/F、K238T
蛋白酶抑制剂[c](PIs)	PI 突变位于底物结合裂隙区内或周围,干扰抑制剂结合,或弥补由底物结合区突变导致的病毒复制能力降低	阿扎那韦(ATV/r):V32I、M46I/L、I47V、G48V/M、I50L、I54V/T/A/S/L/M、V82A/C/F/M/S/T、I84V/A/C、N88S、L90M
		达芦那韦((DRV/r):V32I、I47V/A、I50V、I54L/M、L76V、I84/V/A/C
		洛匹那韦((LPV/r):L24I、V32I、M46I/L、I47V/A、G48V/M、I50V、I54V/T/A/S/L/M、L76V、V82A/C/F/M/S/T、I84A/C/V、L90M
		辅助耐药突变:L10F、V11I/L、K20T、L33F、G73/S/T/C/A、T74P、L89V
整合酶抑制剂(INIs)	突变位于酶活性位点周围氨基酸残基	拉替拉韦(RAL):T66K、E92Q、G118R、F121Y、Y143C/R/H/A/G/K/S、Q148H/R/K、N155H
		埃替拉韦(EVG):T66A/I/K、E92Q、G118R、F121Y、P145S、Q146P、S147G、Q148H/R/K、N155H、R263K
		度鲁特韦(DTG):T66K、E92Q、G118R、Q148H/R/K、N155H、R263K
		比卡格韦(BIC):初步数据表明与 DTG 相似
		辅助耐药突变:H51Y、L74F/M、Q95K、T97A、E138A/K/T、G140S/A/C、S153F/Y、E157Q、G163R/K、S230R
融合酶抑制剂(恩夫韦肽)	突变发生在 gp41 跨膜蛋白的 N 末端重复序列(HR1)区,干扰抑制剂结合	Gp41 突变:G36D/E/V/S、I37V、V38A/E/G/M、Q48H、N42T、N43D/K/S、L44M、L45M

（续 表）

药物种类	机制	耐药突变位点[a]
CCR5 抑制剂（马拉韦罗）	由开始治疗时未检测到的预先存在的 CXCR4 嗜性变异株扩展而来 gp120 突变促进 gp120 与结合了抑制剂的 CCR5 分子结合	CXCR4 嗜性 gp120 变异：gp120 V3 环的 11 位和 25 位正电荷氨基酸残基及其他突变（主要位于 V3 区，不除外其他突变）联合，与 CXCR4 嗜性有关 与抑制剂结合 CCR5 受体有关的病毒 gp120 突变没有统一模式

注：[a] TAMs（胸苷类似物突变）：M41L、D67N、K70R、L210W、T215F/Y、K219Q/E。多重耐药（MDR）突变：①Q151M±A62V、V75I、F77L、F116Y；②T69S_SS（插入）±≥1 TAMs。[b] 由于具有毒性，NRTIs 中去羟肌苷（didanosine，ddI）和司他夫定（stavudine，d4T）不再被作为常规推荐药物用于 ARV 治疗，事实上，它们通常是忌服的。尽管 M184V/I 增加了司他夫定的敏感性，但可分辨的（discriminatory）耐药突变及 TAM 的组合使得两种抗病毒药物敏感性降低（https://hivdb.stanford.edu/dr-summary/resistance-notes/NRTI/）。[c] 几乎没有福沙那韦（fosamprenavir），茚地那韦（indinavir），奈非那韦（nelfinavir），沙奎那韦（saquinavir），替拉那韦（tipranavir）其他适应证[73]。当奈非那韦被广泛使用时，奈非那韦相关的耐药突变 D30N 和 N88D 曾是最常见的。这 2 种耐药突变在传播耐药病例中仍然偶尔可见。N88D 与阿扎那韦（atazanavir）潜在的低度耐药有关。在某些情况下，已经对阿扎那韦、达芦那韦（darunavir）和洛匹那韦（lopinavir）耐药的病毒仍然对替拉那韦敏感。达芦那韦耐药突变中 I50V、I54L 和 L76V 增加了替拉那韦的敏感性（https://hivdb.stanford.edu/dr-summary/resistance-notes/PI/）

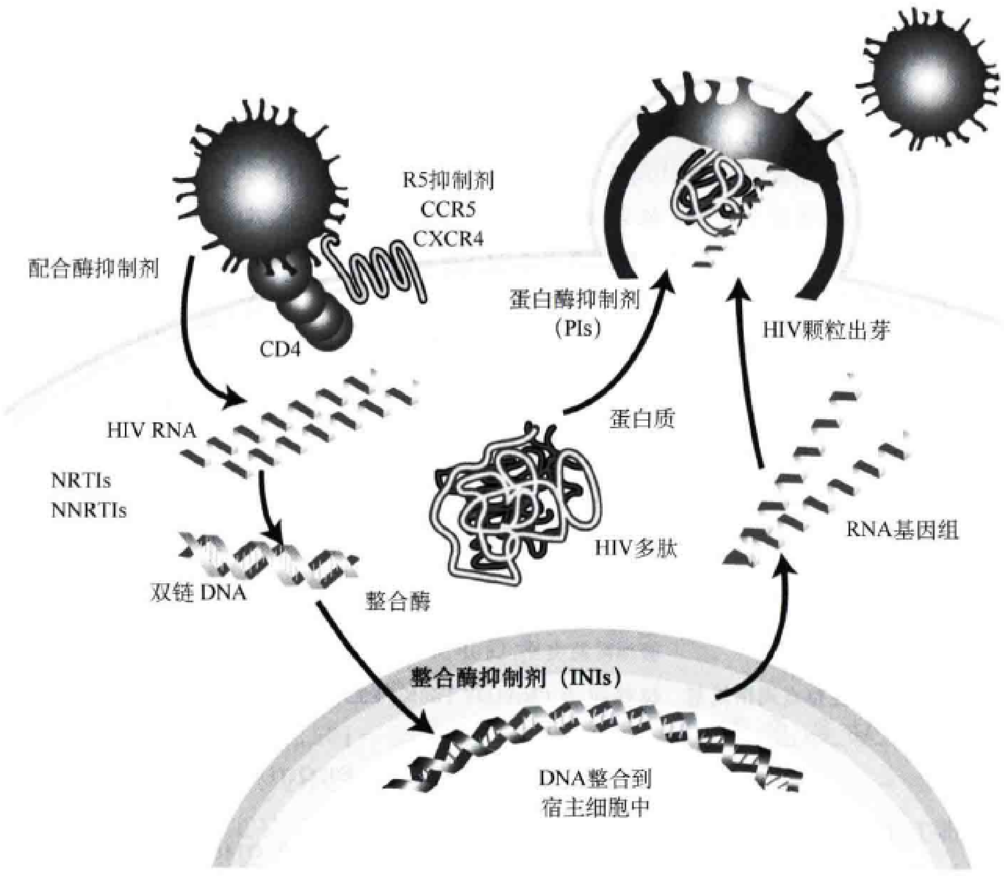


图 114-1 HIV 复制周期的简略图，展示了 6 种抗逆转录病毒药物作用的步骤：融合抑制剂、CCR5（趋化因子受体）抑制剂、NRTIs（核苷逆转录酶抑制剂）、NNRTIs（非核苷逆转录酶抑制剂）、INIs（整合酶抑制剂），PIs（蛋白酶抑制剂），见彩插

HIV-1 遗传变异性的主要原因包括以下几方面：RT 酶错误率高、体内病毒复制率高、序列不同的病毒感染同一个细胞时发生重组，以及感染过程中变异前病毒变异株发生积聚。在同一个患者体内的病毒群由数不清的基因型相关的病毒组成，称为一个准种（quasispecies）。耐药病毒突变株的选择由以下因素决定：在治疗抑制作用不完全时病毒持续复制的程度、获得某特定突变的难

易程度及耐药突变对药物敏感性和病毒复制能力的影响[52]。

在未曾接受过抗病毒治疗且是由对药物敏感的HIV-1感染的个体中，多种不同药物组合使用可以达到长期抑制病毒的效果，使大多数患者获得免疫重建。一旦HIV-1被完全抑制，如果治疗不中断，病毒通常会被持续抑制。但是，因为抗逆转录病毒治疗并不能抑制HIV-1前体病毒DNA，病毒被完全清除是不可能的。无论此前病毒被抑制多久，只要治疗中断，病毒血症及免疫功能下降会随之出现。

HIV-1耐药可以是获得性的，也可通过传播而来。当采取不完全抑制治疗，病毒持续复制时，患者会产生获得性耐药。而不完全抑制的原因以往主要是由于有活性的抗病毒药物数量不够，而目前主要是由于治疗中断或患者依从性不好造成的。在北美，通过传播而获得的NRTI或NNRTI耐药的HIV-1感染者比例约为15%，在许多其他地区，包括欧洲、澳大利亚、南美和中美洲部分地区、加勒比地区及撒哈拉以南非洲的一些国家，这一比例高达10%或更高[53-54]。在开始新的抗逆转录病毒治疗方案之前，无论存在获得性耐药还是传播性耐药，都与患者对该方案的病毒学应答减弱有关[55]。

(一)NRTI耐药

NRTI必须三磷酸化(对核酸类似物替诺福韦需二磷酸化)才具有活性。由于NRTI依赖细胞内的磷酸化发挥作用，在体外评价药物活性十分复杂，因为在敏感性试验需要使用高度活化的淋巴细胞中，磷酸化发生速率不同。而在体内感染细胞的种类更多，这也是NRTI在其动力学范围内耐药水平会有差异的原因[56]。从NRTI治疗失败患者中分离的病毒株对齐多夫定，拉米夫定及恩曲他滨的敏感性可能下降数百倍，但对阿巴卡韦和替诺福韦的敏感性降低很少超过5～10倍。然而，对这类二线药物来说，药物敏感性轻微下降，也是有临床意义的。

NRTI耐药有2种生化机制：机制之一是通过识别性突变降低其RT对NRTI的亲和力，阻止了其掺入到延伸中的DNA链[57]；机制之二是病毒突变促进引物解链，即通过磷酸化作用将已与HIV引物链结合的NRTIs移除[58]。由核苷类似物抑制剂齐多夫定及司他夫定选择出来的引物解链突变，也被称作胸苷类似物突变(TAMs)。最常见的TAMs突变包括有M41L、D67N、K70R、L210W、T215Y/F和K219Q/E。上述突变中的M41L、L210W、T215Y对阿巴卡韦和替诺福韦产生更强的交叉耐药[59-60]。尽管腺苷类似物现在已经很少使用了，特别是在高收入国家，但TAMs仍然很常见，这是由于它们通常存在于接受治疗的患者身上很多年，因为这些突变很多都是可以稳定传播的。

拉米夫定及恩曲他滨的耐药基因屏障较低，单一点突变，如识别性突变M184V(或较少见的M184I)即能引起病毒对上述药物敏感性下降200倍以上。M184V是一线治疗失败患者最常见的耐药突变，尽管M184V影响拉米夫定及恩曲他滨的抗病毒活性，但同时也降低了病毒的适应性，而且提高了病毒对齐多夫定、司他夫定及替诺福韦的敏感性，所以仍然是有效的[56,61]。

患者使用不含有胸苷类似物的治疗方案时，K65R、K70E/Q/G、L74V/I及Y115F常与M184V同时出现[62]。K65R突变引起病毒对替诺福韦、阿巴卡韦、拉米夫定和恩曲他滨的敏感性下降，而提高对齐多夫定的敏感性[63]。L74V/I突变降低病毒对于阿巴卡韦的敏感性。Y115F突变降低病毒对阿巴卡韦及替诺福韦的敏感性。K65N及K70E/Q/G可降低病毒对替诺福韦、阿巴卡韦的敏感性。

T69SSS及Q151M是NRTI的多重耐药突变。T69SSS突变是2个氨基酸插入到HIV-1的RT第69位氨基酸，常与多个TAMs突变一同出现，引起拉米夫定与恩曲他滨中度耐药，以及其他NRTIs的高度耐药[64]。Q151M突变经常与几个非常见突变(A62V、V75I、F77L和F116Y)联合出现，引起替诺福韦、拉米夫定与恩曲他滨中度耐药，及其他NRTIs的高度耐药[65-66]。在67位和70位密码子之间氨基酸缺失也与NRTI多重耐药有关。67位密码子缺失常伴随多个TAMs突变或Q151M突变[67]。69位密码子缺失突变常伴随K65R突变或Q151M突变[67]。

(二)NNRTI耐药

NNRTI通过与RT区活性位点距离10埃的疏水性区域结合而抑制RT发生变构[57]。这个与NNRTI结合的疏水口袋区域保守性不如酶的

dNTP结合位点。实际上，HIV-2和HIV-1 O组对大部分NNRTIs具有天然耐药性。与NRTIs类药物相比，HIV-1 M组病毒对NNRTIs药物的敏感性存在更大变异性[68]。

如果使用NNRTIs单药治疗，耐药会迅速出现，提示预先存在的低丰度耐药突变病毒株可以被NNRTIs药物选择出来。例如，应用单剂量奈韦拉平阻断母婴传播可以选择出NNRTIs相关的突变，而通过标准测序方法几个月才能检出这些突变，会影响到后来应用含有NNRTI治疗方案的效果[69]。

奈韦拉平及依非韦伦的耐药遗传屏障(genetic barriers to resistance)很低，NNRTI结合口袋的单一突变即可以导致高度耐药。依曲韦林的耐药基因屏障较高，需2个或2个以上突变才能导致高度耐药[70]。依曲韦林较高的基因屏障是由于它具有自我重新排列功能，在NNRTI结合区适应各种结合模式[71]，尽管利匹韦林与依曲韦林结构相似，但临床上通常给予利匹韦林剂量要低得多，使其产生临床重要意义耐药的遗传屏障比依曲韦林要低(译者注：遗传屏障低是指产生耐药所需要积累出的耐药相关突变种类和数量少。利匹韦林给药剂量低，相比之下更不容易诱导产生耐药突变)。

最常见的NNRTIs主要耐药突变位点是L100I、K101E/P、K103N/S、V106A/M、Y181C/I/V、Y188C/H/L、G190A/S/E/Q和M230L[72-73]。除Y181C/I/V外，上述突变均可引起病毒对依非韦伦敏感性的中度或高度降低。L100I、K101E/P、Y181C/I/V、G190E及M230L可降低病毒对依曲韦林和利匹韦林的敏感性，而Y188L只降低病毒对利匹韦林的敏感性，不降低对依曲韦林的敏感性。此外，以前未知的E138K/G/Q/A成为接受利匹韦林治疗患者中最常见的突变[74]。虽然这些突变仅能低度降低利匹韦林的敏感性，但它们是在接受含利匹韦林治疗方案的病毒学失败患者中出现的最常见突变。

(三)PI耐药

目前，在美国FDA已批准的9种PIs中，由于利托那韦可抑制细胞色素P4503A通路，仅以其亚治疗剂量给药，以增加其他PIs的组织内浓度。在其余8种PIs中，洛匹那韦(含利托那韦复方)、利托那韦或考比司他加强的阿扎那韦，以及达芦那韦是目前最常用的PIs。

目前，已有PIs选择性的80多个非多态性突变位点的相关报道[75]，大部分突变会降低病毒对一种或者多种PIs的敏感性[76]。在底物结合裂隙处的突变，如D30N、V32I、I47V/A、G48V/M、I50V/L、V82A/T/L/F/S及I84V会降低PIs结合亲和力。还有一些位于酶的口盖区突变，如M46I/L和I54V/M/L/T/S/A及一些在酶核心区突变，如L76V及N88S，也会显著降低药物敏感性。上述突变及其他辅助突变会间接重塑底物结合裂隙区，或补偿由于底物结合区突变引起的酶动力学降低[77]。在应用PIs治疗过程中，也可能选择出gag区裂解位点的补偿突变[78]。

利托那韦加强的洛匹那韦(LPV/r)尤其是利托那韦或考比司他增强的达芦那韦(DRV/r)的耐药遗传屏障较高，需要多个耐药突变才能引起抗逆转录病毒活性受损[79-80]。对于大多数感染者，单独使用LPV/r或DRV/r治疗48周后，均可将病毒RNA完全抑制到可检出水平以下，而且单独使用上述PIs可作为高效的简化方案[81]。在应用包含PI的治疗方案作为初始治疗方案的病毒学失败患者中，很少有PI耐药突变，提示治疗失败常见的原因可能是坚持治疗的依从性差，而非PI耐药[82-83]。事实上，其中很大一部分患者通常不需改变治疗方案即可实现病毒再抑制[84-85]。

(四)INI耐药

在逆转录并形成病毒双链DNA后，HIV-1整合酶催化了保守3′双核苷酸CA的剪切(3′加工)及病毒3′-OH末端与宿主染色体DNA 5′末端的连接(链转移)。HIV-1整合酶包括3个功能域：N-端结构域(NTD)，包括1～50位氨基酸；催化核心域(catalytic core domain，CCD)，包括51～212位氨基酸，含有催化三元组D64、D116和E152；C-端结构域(CTD)，包括213～288位氨基酸，与宿主DNA非特异性结合。IN链转移抑制剂与CCD活性位点结合，然后，与二价铁离子形成螯合物保证酶的功能。2008年，拉替拉韦被批准上市。2012年，埃替拉韦被批准上市，与CYP3A4抑制剂考比司他、NRTIs替诺福韦和恩曲他滨组合作为一种固定剂量复合剂(fixed-dose combination，FDC)使用。2013年，度鲁特韦被单独批准上市，与阿巴卡韦和拉米夫定组合也被作为FDC使用。

2018 年，比卡格韦获批与替诺福韦艾拉酚胺和恩曲他滨组合作为 FDC 使用。

CCD +C 末端域、CCD+ N 末端域及 CCD 与原型二酮酸抑制剂 5CITEP 的结合均具有晶体结构[86-88]。但 CCD、C 末端域、N 末端域及 HIV-1 整合酶四聚体的相对构象[89]，来自于人们对与 HIV-1 整合酶同源的泡沫病毒晶体构象研究所做的推断。近期低温电子显微镜结构研究显示，具有催化活性的 HIV-1 整合酶链转移复合物在催化下结合了病毒及靶 DNA[90]。

对 INIs 敏感性影响最大的许多突变位于 INIs 结合位点的高度保守区及 140～149 位氨基酸残基，后者具有灵活的环状结构，对整合酶与 DNA 结合后的催化起关键作用。Q148 与病毒 DNA 的 5′端胞嘧啶相互作用，与大多数 INIs 形成一个氢键[88,91]。N155 插入到活性位点与 D116 组成一个氢键，构成 3 个催化性的天冬氨酸残基之一[92]。Y143 是参与 DNA 与 INIs 结合的高度灵活的活性位点环状结构的一部分。

与拉替拉韦耐药有关的 3 个主要重叠遗传通路包括：① Q148H/R/K ± G140S/A/C ± E138A/K；② N155H ± E92Q；③ Y143C/R ± T97A[93,94]。埃替拉韦耐药主要是由前 2 个遗传通路及 T66A/I/K 与 S147G 2 个突变引起[95]。度鲁特韦耐药的基因屏障较高。关于引起度鲁特韦临床显著性表型耐药的大部分报道来自于先前使用包含拉替拉韦的治疗方案但病毒学失败的案例。在这些患者中，最常见的与耐药相关的突变包括了 Q148H/R/K 结合 E138A/K/T± G140A/C/S[96]。然而，由于度鲁特韦的广泛应用，已经有越来越多的关于度鲁特韦耐药及其他 INIs 耐药突变的相关报道，其中包括 N155H 及两种罕见突变(G118R 和 R263K)，这种突变是在体外研究及一小部分接受度鲁特韦单药治疗的患者中发现的[97-101]。这些突变的临床意义尚不清楚，这是因为它们通常仅能导致 2 倍甚至更小程度的度鲁特韦的敏感性下降。这些突变可能与病毒复制减少有关，并且很少与其他度鲁特韦耐药突变同时发生。初步研究表明，INI 耐药突变对度鲁特韦所产生的表型效应与近期获批的比卡格韦之间存在高度相关性[102]。

(五)融合抑制剂耐药

HIV-1 包膜由表面糖蛋白(gp120)和跨膜糖蛋白(gp41)组成。gp120 与 CD4 受体及靶细胞的趋化因子辅助受体之一(CCR5 或 CXCR4)结合。在 gp120-CD4-辅助受体结合后，引起 gp41 构象变化，促进病毒与细胞膜的融合。gp41 的 2 个七肽重复区(HR1 和 HR2)组成了一个螺旋束，包括属于 HR1 和 HR2 的三聚体结构。恩夫韦肽是一种高效合成多肽，通过与 HR1 结合阻止其与 HR2 的绑定，从而抑制病毒与细胞膜的融合。

恩夫韦肽耐药毒株在 gp41 HR1 区 36 和 45 位氨基酸出现单或双突变[103-104]。单突变通常使病毒对恩夫韦肽敏感性下降 10 倍，而双突变会使敏感性下降 100 倍。尽管恩夫韦肽是非常有效的抑制剂之一，其耐药基因屏障却很低，当该药未与足量的其他活性抑制剂同时使用时，病毒会很快反弹[105]。

(六)CCR5 抑制剂耐药

马拉韦罗(maraviroc)通过变构方式抑制 CCR5 嗜性 HIV-1 毒株的 gp120 包膜与七跨膜 G 蛋白偶联的 CCR5 受体结合[106]。HIV-1 的 gp120 与 CCR5 的 N 末端及胞外第二环形区结合，而马拉韦罗结合到跨膜螺旋形成的口袋结构[106]。在接受 CCR5 抑制剂治疗的患者中，最常见的病毒学失败原因是预先存在 CXCR4 嗜性病毒的扩增，其对 CCR5 抑制剂具有天然耐药性[107]。与 CXCR4 嗜性相关的因素包括：gp120 V3 环区 11～25 位氨基酸带正电荷残基，以及不局限于 V3 区内的一些不太常见的组合突变[108]。

在体外传代实验中，CCR5 抑制剂通过一个不同的机制引起耐药，即 gp120 突变使 HIV-1 与 CCR5/CCR5 抑制剂复合物结合，造成在 CCR5 抑制剂最大浓度情况下，达到稳定的最大抑制率[109]。然而，这种耐药机制在患者体内很少发生，而一旦出现，也与固有的突变模式无关[110]。

(七)亚型间变异

M 组 HIV-1 在人类传播过程中，已进化出多种亚型，亚型间的基因组差异达到 10%～30%[111]。在不同亚型间，HIV-1 蛋白酶区和 RT 区核苷酸差异达 10%～12%，氨基酸水平差异达 5%～6%。不同亚型毒株自然发生的多态性也有所不同，但这些多态性临床上并不对药物敏感性产生显著影响。

B 亚型病毒在美国占 HIV-1 毒株的 95%，在欧洲占 60%，但在全世界仅占 10%，其在早期的 ARV 研究工作和 ARV 耐药性研究中发挥了巨大的作用。尽管如此，现有的抗逆转录病毒药物在治疗 B 亚型和非 B 亚型病毒上同样有效。此外，除几个特例外，大多数 HIV-1 耐药突变在不同亚型中发生的比例相似[76]。例如，C 亚型病毒株在 63 和 65 密码子之间有一个独特的聚腺苷酸延伸，这导致在替诺福韦暴露后，65 密码子二号位的腺苷三磷酸（A）被鸟苷三磷酸（G）替换，从而导致 K65R 耐药突变[112-113]。大多数其他有倾向性选择的耐药突变的例子是由于亚型间密码子的差异造成的。例如，在接受过依非韦伦治疗的个体中，NNRTI 耐药突变 V106M 在 C 亚型病毒株中发生的频率比在其他亚型中要高得多，这是由于 V106M 在 C 亚型病毒株中发生了单碱基对改变，GTG（V）→ATG（M），而在其他亚型中发生了双碱基对改变，GTA（V）→ATG（M）[114]。

三、乙型肝炎病毒

乙型肝炎病毒（HBV）是部分双链 DNA 病毒，基因组大约 3.2 kb。HBV 感染后，其基因定位于细胞核，变成共价闭合环状 DNA（cccDNA），并作为 mRNA 和基因组 RNA 转录的模板。随后，基因组 RNA 逆转录成病毒 DNA，产生的病毒核心以出芽方式进入到内质网，并从细胞内排出或回到胞核，转换回 cccDNA。HBV 的 cccDNA 可以通过细胞更新消除，但不能通过药物治疗消除，因此，HBV 感染很少能够根除[115-117]。

HBV 高速复制，每天可以产生 10^{11} 个病毒颗粒[118]。在未治疗的情况下，HBV 的 DNA 水平通常可高达 10^8～10^{10} 拷贝/ml。HBV 聚合酶具有逆转录酶（RT）活性，在功能上和结构上都与 HIV-1 的 RT 相似，错误率也与其他逆转录病毒相似[119]。然而，HBV 基因可读框的重叠分布限制了许多自发性突变[120]。例如，编码 HBV 聚合酶的核苷酸在不同的阅读框中也会编码 HBV 包膜。因此，HBV 的突变率变得固定且明显低于 HIV-1[121]。

HBV 分为至少 8 种基因型，不同基因型之间的核苷酸差异约为 10%。几个小型研究表明，不同基因型的病毒对干扰素反应不同或对某种耐药突变的偏好不同，但是尚无证据表明基因型会影响对药物治疗的反应[122-126]。

（一）抗 HBV 药物治疗

目前，有 2 种干扰素及 6 种核苷类似物获批用于慢性 HBV 感染治疗（表 114-3）。1992 年，α 干扰素获批上市，2005 年，聚乙二醇 α 干扰素 2a 获批上市。由于治疗 1 年可能实现稳定的病毒学缓解，聚乙二醇干扰素仍是一个重要的治疗选择[127]。6 种核苷类似物中，拉米夫定（1998）、阿德福韦（adefovir）（2002）、恩替卡韦（entecavir）（2005）、替比夫定（telbivudine）（2006）、替诺福韦（tenofovir）（2008）和替诺福韦艾拉酚胺（tenofovir alafenamide）（2015）分别获批上市。替诺福韦和替诺福韦艾拉酚胺具有相似的适应证和耐药性。恩曲他滨与拉米夫定的化学结构及抗病毒活性相似，由于恩曲他滨与替诺福韦和替诺福韦艾拉酚胺可联合用于治疗 HIV-1，所以也被用于 HBV 的治疗。

HBV 的初始治疗推荐单独使用恩替卡韦，替诺福韦或替诺福韦艾拉酚胺，因为每种都是有效的 HBV 抑制剂，在初始治疗中接受替诺福韦或替诺福韦艾拉酚胺的患者均未出现耐药性，且接受恩替卡韦的患者也极少出现 HBV 耐药[127-130]。有研究证明，最近获批使用的替诺福韦艾拉酚胺与替诺福韦具有相同的疗效，并且能降低肾功能不全和骨质减少的发生[127,131]。

由于长期使用拉米夫定、阿德福韦和替比夫定治疗，会导致病毒学失败和耐药性的发生率增高，因此这些药物的使用已大大减少。应用拉米夫定治疗 1 年有 15%～30%的患者产生耐药，治疗 3 年则有 40%～50%患者产生耐药，治疗 5 年以上耐药率高达 70%[132]；替比夫定治疗 2 年则有 25%发生耐药率[133]；阿德福韦在治疗 2 年和 5 年后，耐药发生率分别为 10%和 30%[134]。

表 114-3　乙型肝炎病毒(HBV[a])抑制剂耐药的遗传机制

药物类型	机制	耐药突变(DRMs)
干扰素	未知	未知
核苷/核苷酸类似物(NRTIs)	使RT可识别NRTIs及自然存在的三磷酸核苷的突变。有些突变是否导致引物解链尚不清楚	L-核苷酸： 拉米夫定(LAM,3TC)：M204I/V、L180M+M204V、A181T/V 替比夫定(LDT)：M204I、L180M+M204V、A181T/V 辅助 DRMs：L80I、I169T、V173L、T184G、S202G/I、M250V 脱氧鸟苷酸类似物： 恩替卡韦(ETV)：M204I/V+L180M 辅助耐药突变：L80I、I169T、V173L、T184G、S202G/I、M250V 无环核苷酸： 阿德福韦(ADV)：A181T/V、N236T 替诺福韦(TDF)：A181T/V、N236T 替诺福韦艾拉酚胺(TAF)：A181T/V、N236T

注：[a] 恩曲他滨(FTC)并不是 FDA 批准用于 HBV 的治疗药物，其活性及交叉耐药与拉米夫定相似，常与替诺福韦一起用于治疗 HIV 共感染的患者

(二)HBV RT 及 NRTI 耐药

同源性模型提示，HBV 聚合酶具有与 HIV-1 类似的手指、手掌和拇指结构[135-136]。YMDD 基序为逆转录酶共有的特征，该基序的 M204V/I 突变引起拉米夫定高度耐药(>1000 倍)，与引起 HIV-1 拉米夫定耐药的 M184V/I 突变相似[137-138]。一些补偿突变会与 M204V/I 同时出现，特别是 L180M。M204V/I 可引起恩曲他滨及替比夫定高度交叉耐药，但不会降低对于无环核苷酸类药物阿德福韦和替诺福韦的敏感性[137-138]。尽管 M204V/I 突变的病毒比野生型病毒复制能力低，M204V/I 的出现与病毒学及临床进程相关[139-140]。

体外试验中，阿德福韦和替诺福韦对具有 M204V/I 突变及其他相关突变的病毒具有完全的敏感[141-142]。然而，由于替诺福韦及替诺福韦艾拉酚胺比阿德福韦更强效，并且有更高的耐药基因屏障，因而推荐用于拉米夫定耐药的患者[137]。N236T 及 A181V/T 突变可引起阿德福韦敏感性下降 3～10 倍[143-145]，虽然比 M204V/I 突变引起拉米夫定耐药的程度低很多，但其药物敏感性下降与接受阿德福韦治疗患者的病毒学突破有关[143]。N236T 只引起替诺福韦及替诺福韦艾拉酚胺低度交叉耐药，而对拉米夫定、恩替卡韦或替比夫定无影响[146-147]。

拉米夫定，尤其是阿德福韦常引起 A181V 和 A181T 突变[144,148-149]。A181T 可造成 S 蛋白可读框上的终止密码，可能引起肝细胞内病毒持续复制，但不伴随病毒反弹[150]。携带上述突变的分离株对恩替卡韦仍敏感，但在体外对替诺福韦和替诺福韦艾拉酚胺的交叉耐药最低[137,147,151]。

M204V/I 和 L180I 再加上一个或更多的下述突变：I169T、T184G、S202I 和 M250V，会引起依曲韦林高水平耐药[137,147,152]。尽管恩替卡韦对拉米夫定耐药的病毒仍有一定的抗病毒活性，恩替卡韦用于拉米夫定耐药的患者时，仍有显著风险出现病毒学失败及出现高水平耐药情况[125,153-156]。

尽管替诺福韦对具有阿德福韦耐药突变的患者仍有一定的抗病毒活性，但与未发生此类突变的患者相比，替诺福韦单药治疗的病毒学应答较慢[157-158]。因此，对于有阿德福韦耐药突变但没有拉米夫定用药史或拉米夫定耐药突变的患者，通常建议使用恩替卡韦单药治疗。然而，对于多药耐药的患者，推荐使用替诺福韦(或替诺福韦艾拉酚胺)联合拉米夫定、恩曲他滨或恩替卡韦[147,156,159]。一旦出现病毒抑制，单独使用替诺福韦或替诺福韦艾拉酚胺可用于长期治疗[160]。

四、丙型肝炎病毒

丙型肝炎病毒是一种单股正链有包膜病毒，基因组长度 9.5 kb。病毒复制发生在膜相关的胞浆复制酶复合体上，该复合体包括了非结构蛋白

NS3蛋白酶、NS4A蛋白酶辅助因子、NS5B RNA依赖性RNA聚合酶(RdRp)及2种膜相关蛋白NS4B和NS5A。NS4B是一种膜锚定蛋白,NS5A在调节RdRp功能中起重要作用,与宿主蛋白有多种相互作用[161]。在合成负义RNA中间体后,可产生多个正义子代RNA,用于RNA翻译或融合进入病毒颗粒[161]。

目前有6个主要的HCV基因型,彼此间基因组差异超过30%,并且最近发现了2种极为罕见的基因型[162-163]。每种基因型都能被细分为不同亚型,不同亚型间的差异超过15%[162]。据统计,HCV 1型和3型(GT1和GT3)分别占全球感染的46%和30%[163]。与其他RdRp一样,HCV聚合酶错误率很高,估计每个复制周期有10^{-4}/核苷酸发生替换[164]。HCV在体内以病毒基因组的整体形式存在,它们之间的差异高达5%~10%,被称为准种[165]。

血浆HCV通常维持在$10^{4.5}$~$10^{6.5}$ U/ml。HCV的半衰期小于3 h。在无抗病毒治疗的情况下,每天会产生10^{12}病毒颗粒[166]。70%~80%的未治疗的HCV感染者HCV持续存在。但由于没有稳定的细胞内的储存库,仍具有完全清除HCV的可能性。实际上,在治疗了12周和(或)24周后就在血浆中检测不到病毒,就等同于持续的病毒学反应(SVR)和病毒学治愈[167]。

利用稳定转染的复制子对HCV进行体外研究,发现这些复制子能够自主复制,但不能产生传染性HCV颗粒,并且只能用独特的JFH-1感染性克隆的嵌合体[168-170]。这些测定方法对于发现抗病毒药物、量化其抑制活性、筛选耐药突变及评估各种突变的表型效应至关重要[168-170]。

(一)抗HCV治疗

2011年前,长效干扰素加利巴韦林(ribavirin)治疗6~12个月是治疗HCV唯一的推荐方案。2011年,第一代蛋白酶抑制剂替拉瑞韦(telaprevir)和波普瑞韦(boceprevir)作为第一个FDA批准上市的直接作用剂(directly acting agents,DAAs)与长效干扰素和利巴韦林联合使用,用于治疗1型HCV。干扰素、利巴韦林与PIs合用,可使1型HCV感染者的治愈率提高到70%左右,但伴随而来的是频发的药物毒副作用和较高的耐药率。干扰素和第一代蛋白酶抑制剂已经被更新的DAAs所取代,在固定剂量复合剂(FDCs)中使用的DAAs的SVR率通常为大于95%。

2013—2017年,FDA批准了13个DAAs:核苷/核苷酸类似物RdRp抑制剂(NI:索非布韦),5种PIS:司美匹韦(simeprevir)、帕利瑞韦(paritaprevir)、格佐匹韦(grazoprevir)、格拉卡匹韦(glecaprevir)、伏西瑞韦(voxilaprevir);6种NS5A抑制剂:达卡他韦(daclatasvir)、雷迪帕韦(ledipasvir)、奥比帕利(ombitasvir)、艾尔巴韦(elbasvir)、维帕他韦(velpatasvir)、哌仑他韦(pibrentasvir)及非核苷RdRp抑制剂达塞布韦(dasabuvir)(表114-4)。索非布韦(sofosbuvir)可以单独使用,也可以作为3个FDCs的成分。蛋白酶抑制剂司美匹韦(simeprevir)[171]和NS5A抑制剂达卡他韦(daclatasvir)[172]则只能单独使用。其余DAAs可在FDCs中使用,而达塞布韦(dasabuvir)与FDC一起使用。

表114-4 丙型肝炎抑制剂耐药的遗传机制

药物类型	机制	RASs[a]
干扰素	病毒及宿主遗传因素	无
利巴韦林	未知	无
核苷类抑制剂(NIs)	NS5B突变:发生在活性位点附近,抑制核苷类似物的结合	索非布韦(SOF):L159F、S282T和V321A 辅助RASs:C316N和L320F
非核苷类抑制剂(NNI)	NS5B突变:阻止与NNI结合区结合	达塞布韦:C316Y、M414I/T、C451R、A553T、G554S、S556G和G558R[174,200]

（续 表）

药物类型	机制	RASs[a]
蛋白酶抑制剂[b]（PIs）	在 NS3 蛋白酶底物结合裂隙内或附近发生的突变	司美匹韦：F43I/S/V、Q80K/R、R155K/T、A156G/S/T/V、D168A/E/H/I/T/V/Y[204]
		帕利瑞韦：F43L、Y56H、R155G/K/S/T、A156T、D168A/E/F/H/N/V/Y[174,185,200,206]
		格佐匹韦：Y56F/H、R155K/Q、A156G/T/V、V158A、D168A/E/G/N/S/V/Y[35,175,185]
		格拉卡匹韦：Y56H、Q80K/R、R155K/T、A156G/T/V、D168A/L/R/T[177]
		伏西瑞韦：A156L/T/V；41 位和 168 位的 RASs 在体外也被选择，可导致敏感性降低[179]
NS5A 抑制剂[c]	NS5A N-末端结构域突变，干扰与 NS5A 抑制剂的结合	达卡他韦：M28T、Q30E/H/K/R/S、L31F/M/V、H58D、Y93C/H/N[172,214]
		奥比帕利：M28A/T/V、Q30E/K/R、L31V、H58D、Y93C/H/L/N[174,200]
		雷迪帕韦：K24R、M28A/G/T、Q30E/G/H/K/L/R/Y、L31M/V、P32L/S、H58D、A92K、Y93C/H/N/S[173,187,217]
		艾尔巴韦：M28A/G/S/T、Q30D/E/G/H/K/L/R/S/Y、L31F/M/V、H58D、Y93C/H/N/S[167,175]
		维帕他韦：Y93H/N；其他 RASs 包括 GT1b 中的 Q30R 和 L31I/M/V，以及 GT3 中的 M28T、A30K、L31V 和 E92K，以上均可导致敏感性降低[176,211]
		哌仑他韦：所有单 RASs 导致的敏感性下降在 10 倍以内；而一些 RASs 组合可导致敏感性下降 100 倍以上[177,212]

注：[a] 在 HCV 域中，由于含有一致的氨基酸，并且 DAAs 选择的氨基酸及其表型效应具有高度的基因型及亚型依赖性，因此更常使用"耐药相关替代物"（resistance-associated substitutaions，RASs）一词而非"耐药突变"。此表列出了在体外或在患者中选择的氨基酸变异，并显示可以降低一个或多个 HCV 基因型的药物敏感性。突变位置前的氨基酸是 GT1A 所共有的。RASs 按位置排列，每个位置按字母顺序排列。如果一个或多个氨基酸在治疗过程中被普遍选择，或在体外与敏感性降低明显相关，则 RAS 位点将标有下画线。表中大部分数据来自 GT1a 和 GT1b 病毒。在未使用 DAA 个体的不同基因型中天然发生的 RASs 的综合数据也已发表[203]。在治疗过程中不同基因型选择的 RASs 和不同基因型 RASs 表型的综合数据，通常可以在每个 DAA 的包装说明书中找到，在最近发表的 2 篇综述中也有提到[183,217]。[b] 在任何情况下都不再推荐使用特拉匹韦和波西普韦。最常见的针对特拉匹韦和波西普韦 RASs 包括 V36A/C/L/M、T54A/S、R155K/T 和 A156S/V/T，而 V170A 仅为针对波西普韦的 RASs。尽管司美匹韦在一些条件有限的地区是最经济的选择，但也不再是常规推荐药物。[c] 由于许多 RASs 作为一个或多个基因型的共有或共同多态性而存在，因此预先存在的 NS5A 抑制剂 RASs 是常见的。M28L 在 GT1、GT2 和 GT4 病毒中，Q30A/K/L/R 在 GT1 和 GT4 病毒中，L31M 在 GT2 和 GT4 病毒中占很高比例[203]。Y93H 发生在大约 10%的 GT1b 病毒和 5%～10%的 GT3 病毒中[187]

目前，推荐用于初始治疗的 FDCs 包括：①索非布韦/雷迪帕韦用于 GT1 和 GT4 病毒[173]；②利托那韦加强的帕利瑞韦（paritaprevir/r）/奥比帕利＋达塞布韦用于 GT1 病毒，利托那韦加强的帕利瑞韦/奥比帕利用于 GT4 病毒[174]；③格佐匹韦/艾尔巴韦用于 GT1 和 GT4 病毒[175]；④索非布韦/维帕他韦可用于所有基因型[176]；⑤格拉卡匹韦/哌仑他韦可用于所有基因型[177]。索非布韦/维帕他韦/伏西瑞韦可作为泛基因型治疗，用于在 DAA 治疗中出现过病毒学失败的患者，特别是那些应用了含 NS5A 抑制剂的方案的患者[178-179]。

因为治疗效果受多重因素影响，治疗指南十分复杂，例如，HCV 基因型、是否存在肝硬化、是否有使用干扰素治疗方案的病毒学失败史、是否有使用无干扰素 DAA 治疗方案的病毒学失败史及治疗时间等[167,180]。此外，利巴韦林仍然是许多无干扰素的 DAA 治疗方案的辅助成分，特别是用于治疗有肝硬化、以前的治疗失败，或者有已知的或可能产生 DAA 耐药的 GT1 和 GT3 患者[181-182]。

（二）HCV 耐药性原理

许多研究已经证实了在体外传代实验和病毒学失败患者中均出现了 HCV 突变。在 HCV 领域中，人们更多使用"耐药相关替代"（resistance-associated substitutions，RASs）而非"耐药突变"（drug-resistance mutations），因为含有一致的氨基酸，并且 DAAs 选择的氨基酸及其表型效应具有高度的基因型依赖性。主要在 GT1 亚型 a（GT1a）和亚型 b（GT1b）的复制子和感染性克隆中评估 RASs 的表型效应。越来越多关于 GT2～GT6 复制子和克隆体的研究表明，同一个 DAA 在不同的基因型中往往选择不同的 RASs，并且同一个 RASs 在不同的基因型中往往产生不同的影响。尽管只有关于 GT1a 和 GT1b 之间的差异的

研究已经比较透彻，但同一基因型内不同亚型之间的耐药性概况也可能不同。虽然在 PI 类和 NS5A 类中存在广泛的交叉耐药，但这些类中较新的 DAAs 通常具有泛基因型活性，并且有明显较高的耐药基因屏障。

由于 RASs、DAA 方案、HCV 基因型和亚型、肝病程度及治疗时间之间复杂的相互作用，对特异性 RASs 和 SVR 率的联合分析也变得复杂。为了使这些分析易于处理，大多数研究都集中在敏感性降低幅度最大的 RASs 上，即对 NS5A 抑制剂的敏感性降低大于 100 倍，对 PIs 的敏感性降低大于 10 倍的 RASs[183-186]。目前形成的一种共识，即通过 Sanger 测序或通过下一代测序方法检测到水平≥15%的 RASs 比存在低水平的 RASs 更具临床意义[167-187]。

已有多个临床试验在探究基线 RASs 检测对 SVR 率的影响。大多数研究评估了初次应用 DAA 患者中 RASs 多态性的临床意义。在这类患者中，有几种临床情况表明，存在一种主要的 NS5A 抑制剂 RAS 可以降低 SVR 的发生率[167,188-191]。然而，由于测序分析并未广泛应用及标准化，且基线 RASs 对治疗是否成功的影响并不大，导致了基因型耐药检测的指征推进缓慢[167,190,192]。尽管如此，基因型耐药性检测的指征仍将继续推进，并最终可能发挥越来越大的作用，特别是对以前在应用 DAA 方案时发生过病毒学失败患者的治疗中。

(三)核苷酸和非核苷 RdRp 抑制剂耐药

HCV RdRp 由 NS5B 基因编码的 530 个 N 端氨基酸组成。作为一个更大的病毒复制复合物，NS5B 的延伸 C 端锚定在内质网上的催化结构域。与其他聚合酶一样，HCV RdRp 包括掌状、拇指和手指子结构域，可覆盖 RNA 模板凹槽和甘氨酸-天冬氨酸-天冬氨酸催化三联体[193]。HCVRdRp 抑制剂包括链终止核苷酸类似物索非布韦和非核苷 RdRp 抑制剂(NNI)达塞布韦。

RdRp 的催化位点在基因型间高度保守，表明了索非布韦具有泛基因型活性。在体外实验中，S282T 活性位点突变是索非布韦在所有 HCV 基因型中选择的主要 RAS [194-195]。S282T 突变可导致索非布韦敏感性降低 3～20 倍(取决于基因型)，并且该突变与病毒复制适应性显著降低有关[194-195]。在数项临床试验中，上述现象仅短暂地在 1 例接受索非布韦的患者中观察到[196]。

L159F 突变出现在 7%的初次应用 DAA 的 1b 基因型患者序列中，但在其他情况下是一种非多态性突变[197]。在接受索非布韦治疗的患者中，5%的患者可用 Sanger 测序检测到该突变，通常伴有补偿性突变 C316N 或 L320F[196,198]。根据不同的基因型，L159F 可导致索非布韦的敏感性最少降低 1.2～2.0 倍。V321A 是由索非布韦在不到 5%的病毒学失败患者中选择而来的非多态性突变[197]，可导致索非布韦敏感性降低 1.2～1.4 倍，并且可使其复制能力减弱[197]。尽管在体外实验中 L159F 和 V321A 对敏感性的影响很小，但在有较大病毒学失败风险的患者中，L159F 和 V321A 可能导致未达到 SVR 的风险增加[197-198]。

达塞布韦是 FDA 唯一批准的 NNI，它可以变构结合到 RdRp 手掌和拇指结构域之间的口袋区域。达塞布韦有抗 GT1a 和 GT1b 病毒变异株的活性，且常与 FDC(利托那韦加强的帕利瑞韦/奥比帕利)联合使用[199]。最常见的治疗中出现的针对达塞布韦的 RASs 包括 C316Y、M414T、S556G，以及 553 和 561 位置之间的一些 RASs[174,200]。尽管在 10%～35%未应用 DAA 患者的 GT1b 病毒中出现了 S556G 突变，且该突变可导致药物敏感性降低 10 倍，但还没有显示该突变会导致病毒对利托那韦加强的帕利瑞韦/奥比帕利联合达塞布韦的反应性降低[200-201]。

(四)蛋白酶抑制剂

NS3 丝氨酸蛋白酶由 NS3 的 189 个 N 末端氨基酸组成。NS3 蛋白酶与 NS4A 的 54 氨基酸形成异二聚体，在 HCV 多肽前体区形成四个酶切位点，从而生成 NS4A、NS4B、NS5A 及 NS5B 的 N 末端。HCV 蛋白酶似乎也通过剪切几个关键的细胞内免疫介质来参与宿主的免疫逃逸[161]。通过 X 射线成像已经获得了许多含有或不含抑制剂的蛋白酶的晶体结构[202]。HCV 蛋白酶包含了 H57、D81 及 S139 催化三联体，其具有与丝氨酸蛋白酶的胰蛋白酶家族的其他成员相同的特征。

随着新 PIs 获批使用，其具有活性的基因型范围扩展了，并且耐药基因屏障也提高了。首批第一代 PIs，替拉瑞韦(telaprevir)和波普瑞韦(bo-

ceprevir)有抗 GT1 变异株的活性,但容易受到许多 RAS 的影响。第二批第一代 PIs 司美匹韦(simeprevir)、帕利瑞韦(paritaprevir)和格佐匹韦(grazoprevir)获批用于 GT1 和 GT4 株的治疗。然而,与随后获批使用的 4 个 PIs 相比,司美匹韦抗 GT1 株的活性更低[171,185]。2017 年,第二代 PIs 格拉卡匹韦(glecaprevir)和伏西瑞韦(voxilaprevir)获批可作为 FDCs 用于所有 HCV 基因型的治疗[177,179]。

PIs 最常见的 RASs 发生在蛋白酶底物裂隙处或其附近的 36、43、54、55、56、80、155、156、168 和 170 位置[183,201]。除了 Q80K,这些 RASs 在 GT1 株中是非多态的。Q80K 具有多态性,发生在 30%的北美 GT1b 感染且未应用 DAA 的患者体内,但这种情况似乎在欧洲的 GT1b 患者中较少发生。Q80K 可使病毒对于司美匹韦的敏感性降低大约 10 倍[203-204],并且在几种临床情况下,它可将含司美匹韦方案的 SVR 率降低[183,189]。

对于最近获批的 4 个 PIs,最重要的 RASs 是在 155、156 和 168 位置发生的替换。基于 PI、基因型和氨基酸替换的多重影响,在这些位置的 RASs 可使病毒敏感性降低达 100 倍[185-186,202]。这些位置的大多数 RASs 会降低病毒适应性,并且在停药后的数周至数月内逐渐被野生型变异株所取代[190,205]。在这些 RASs 中,在体外帕利瑞韦选择的突变为 R155G/K/S、A156T 和 D168A/E/F/H/N/V/Y,而体内主要为 R155K 和 D168V 突变[174,200,206],格佐匹韦在体外选择的突变为 R155K、A156G/T/V 和 D168A/E/G/N/S/V/Y,体内主要为 D168 位置的突变[35,75]。尽管 Q168 是公认的 GT3 氨基酸[203],但这一残基似乎不能解释帕利瑞韦和格佐匹韦抗 GT3 病毒活性的显著降低[207]。在接受含有二代 PIs(格拉卡匹韦、伏西瑞韦)的 FDCs 治疗的患者中,选择出的 RASs 可用数据很少[177,179]。

(五)NS5A 抑制剂

NS5A 是一种由 450 个氨基酸组成的膜结合磷蛋白,是 HCV 复制酶复合物的重要部分。NS5A 通过 N-末端的两性 α 螺旋锚定在内质网上。NS5A 包含一个结构化的 N-末端结构域,该结构域可能以二聚体形式与 HCV RNA 结合[161,208]。NS5A 抑制剂与 NS5A 的 N-末端结构域(结构域Ⅰ)结合,防止 NS5A 与病毒 RNA 结合,从而干扰 HCV 复制酶复合物的形成,抑制病毒颗粒的装配和释放[208-210]。每一种 NS5A 抑制剂都能达到皮摩尔水平,而且随着新的 NS5A 抑制剂获批使用,它们的活性谱被拓宽,耐药基因屏障也被提高[211-212]。

NS5A 抑制剂 RASs 发生在 NS5A 的 N 末端,位于 24~93 位点之间,可在大多数 NS5A 抑制剂治疗方案病毒学失败的患者中发现[200,213]。RASs 常以协同的方式出现,可以抵消掉许多 NS5A 抑制剂的过强的效能[190,208,214]。大多数 NS5A 抑制剂 RASs 与病毒最小适应性代价相关,当它们在治疗过程中出现时,即使没有药物选择压力,也可能会持续数月至数年[190,213-214]。

在体外实验和接受 NS5A 抑制剂的患者中,最常见的 GT1 RASs 发生在 NS5A 抑制剂与 NS5A N-端结构域结合区域的 28、30、31 和 93 位[208]。GT1a 中最常见的具有临床意义 RASs 为 M28A/G/T、Q30D/E/G/H/K/L/R/T、L31I/M/V、Y93C/H/N/S,而在 GT1b 中则为 L31V,Y93H/N[167,187,215]。

在 GT1a 病毒中,以下 RASs 可使病毒对 1 种或多种抑制剂的敏感性降低至少 100 倍。M28T:达卡他韦和利托那韦片;Q30R:达卡他韦、利托那韦片、雷迪帕韦、艾尔巴韦;L31M 和 L31V:使用达卡他韦、利托那韦片、雷迪帕韦、艾尔巴韦;Y93H/N:达卡他韦、利托那韦片、雷迪帕韦、艾尔巴韦及维帕他韦[190]。由于除哌仑他韦外,Y93H/N 可使每个 NS5A 抑制剂的敏感性至少降低 1000 倍,因此 Y93H/N 可能是最重要的 RAS。另外,还有一些不常见的 RASs 包括 K24G/N/R、P32L/S、H58DL//R 和 A92K/T[183,208]。

许多 NS5A 抑制剂 RASs 具有高度多态性。例如,对于未使用 NS5A 抑制剂患者,GT1、GT2 和 GT4 中出现高比例的 M28L;Q30A/K/L/R 在 GT1、GT2、GT3 和 GT4 病毒中比例较高;而 L31M 在 GT2 和 GT4 株中比例较高[203,208]。在 GT1b 株中 Y93H 发生的概率大约为 10%,在 GT3 株中约 5%[203,216]。总的来说,在治疗前,约 10%的 GT1 和 20%的 GT3 病毒可以通过 Sanger 测序检测到 1 个或多个 RASs[189,203,217]。

截至 2017 年,美国肝病研究协会/美国传染病协会的指南建议:对于考虑使用艾尔巴韦/格佐

匹韦的GT1a感染患者[188]；有干扰素治疗史且考虑使用雷迪帕韦/索非布韦的GT1a感染患者[187,217]；未接受治疗的GT3肝硬化患者或有干扰素治疗史，且目前正在考虑使用达卡他韦/索非布韦或维帕他韦/索非布韦的患者[190,218]，都要进行NS5A基因型耐药检测。在这些患者中，检测到治疗前RASs并伴有病毒敏感性降低大于100倍，将建议在治疗时添加利巴韦林和(或)延长治疗，或考虑使用含有不同的DAA的方案[190]。

(六)利巴韦林

由于利巴韦林对所有基因型的病毒都有抗病毒活性，没有选择性耐药，并且能增加许多治疗方案的SVR率，因此，利巴韦林可能仍然是许多治疗方案的重要组成部分[181-182]。利巴韦林最可能的作用机制是增加病毒突变的形成。这一机制与观察到的临床疗效和深入的测序研究结果最为一致[219-220]。利巴韦林也可轻度直接地抑制HCV RNA聚合酶[182]。利巴韦林的耐药机制尚不明确。

五、流感病毒

流感病毒A和流感病毒B具有分节段的负链RNA基因组，每个基因组都与很多拷贝的核蛋白以及核蛋白复合物中的3种聚合酶(PA、PB1和PB2)蛋白相关。在流感病毒A和流感病毒B包膜中嵌入了2种刺突糖蛋白：血凝素(HA)和神经氨酸酶(NA)，以及一种M2通道蛋白。

已有16种HA和9种NA抗原亚型的流感病毒A的报道，其主要在禽类中。其中一些亚型已经感染了人类。特别是A型H1N1、H2N2和H3N2亚型流感病毒是20世纪人类流行病和大流行的罪魁祸首。2009年，猪源性流感病毒A(H1N1)变种[A(H1N1)pdm09]在墨西哥出现并在世界范围内传播，导致21世纪的第一次大流行[221]。流感病毒B也会造成每年流感流行。自1983年以来，流感病毒B的分离株被分为2个不同的基因谱系(即B/Yamagata/16/1988-和B/Victoria/2/87样病毒)。除了人的流感病毒株，还有2种可感染人的高致病性禽流感病毒株：一种是A(H5N1)，从1997年开始通过水禽广泛传播，已经在中国、东南亚、中东、非洲和欧洲引发了人类感染[222]；另一种是A(H7N9)，自2013年3月以来，在中国感染超过了1400人[223]。

在美国，有2类批准上市的抗流感病毒药物：M2通道阻滞剂(金刚烷衍生物、金刚烷胺和金刚乙胺)及NA抑制剂[扎那米韦(zanamivir)、奥司他韦(oseltamivir)和帕拉米韦(peramivir)](表114-5)。M2通道阻滞剂对当前流行的流感病毒A无效，对流感病毒B也天然不具活性[224]。NA抑制剂对大多数的流感病毒A和B型都有活性。扎那米韦(zanamivir)批准通过吸入使用，在急救时也可以静脉注射[225]。帕拉米韦(paramivir)是一种静脉注射的NA抑制剂，2010年在日本和韩国获批使用，最近在包括美国和加拿大等其他国家也获得了批准[226]。

表114-5 流感病毒抑制剂耐药的遗传机制

药物种类	机制	耐药突变
M2通道阻滞剂 金刚烷胺 金刚乙胺	M2跨膜突变阻止了氢离子转运	在27、30、31、34位氨基酸残基的突变，特别是S31N，和大多数的流行亚型A(H3N2)、A(H1N1)pdm09和致病性的禽流感病毒A(H5N1)和A(H7N9)，均由S31N引起耐药。 流感病毒B不具有M2离子通道，对金刚烷胺类药物有天然耐药性
神经氨酸酶(NA)抑制剂(NAI) 奥司他韦 扎那米韦 帕拉米韦	在受体结合位点的NA突变，使抑制剂结合下降	A(H1N1)和A(H1N1)pdm09： 奥司他韦：H274Y、E119G/D、Y155H、I222M/R/K、S246N/G、N294S 扎那米韦：Q136K、E119G/D、Y155H、I222R 帕拉米韦：H274Y、Q136K、E119G/D A(H3N2)： 奥司他韦：E119V/I、R292K、N294S、Del245-248 扎那米韦：D151A、R292K、E119I、N294S 帕拉米韦：R292K、E119I

（续　表）

药物种类	机制	耐药突变
		A(H5N1)： 奥司他韦：H274Y、N294S 帕拉米韦：H274Y A(H7N9)： 奥司他韦：R292K、E119V、I222R/K 扎那米韦：R292K、I222R 帕拉米韦：R292K、I222R 流感病毒B： 奥司他韦：R152K、R371K、D198N/E、I222T 扎那米韦：R152K、R371K、D198N/E、I222T 帕拉米韦：D198N、R152K

(一)M2通道阻滞剂

M2是一种依赖pH激活的质子选择性通道的四聚物，对于病毒脱壳有作用[227]。氢离子通过内吞作用经过M2通道进入病毒体，促进M1从核糖核蛋白复合物中解离。金刚烷胺和金刚乙胺干扰氢离子穿过M2通道，从而阻止核糖核蛋白复合物转运到细胞核内[228]。

金刚烷耐药过去发生在30%的使用金刚烷胺和金刚乙胺治疗几天后的患者中[229-230]。对金刚烷胺和金刚乙胺耐药的突变株在人体中可引起典型的疾病，并具有传染性[229]。自2004年A/H3N2病毒和2009年A(H1N1)pdm09病毒中出现对金刚烷的自然抗性后，目前不推荐使用这类抗病毒药物。耐药性是由于M2蛋白的5个密码子(26、27、30、31和34位)中的一个替换而引起的[231](表114-5)。

(二)神经氨酸酶抑制剂(NAIs)

HA和NA蛋白在流感病毒生命周期中起重要作用。HA使病毒附着在宿主细胞的唾液酸受体上，NA的酶活性可以裂解α2,3和α2,6唾液酸残基上的末端-N乙酰神经氨酸(Neu5Ac)。NA的这种活性对于病毒粒子从宿主细胞释放和促进病毒在呼吸道的传播非常重要[232]。

通过X射线晶体技术已经得知流感病毒B及几个流感病毒A的NA三维结构[232-234]。NA为一个含有单体的同源四聚体，每个单体由大约470个氨基酸组成，因病毒型别而异。NA在N端具有疏水作用的肽负责膜的锚定，一个球状的头部含有活性位点，是唾液酸与底物类似物结合的口袋结构。最常用的编号系统是基于与流感病毒A的N2亚型比对而来。

不同亚型的流感病毒A的NA之间氨基酸差异约50%，而流感病毒A和B的差异可达70%。尽管如此，在所有病毒株中相似氨基酸构成多肽的折叠结构是几乎不变的。在这些不变的氨基酸中有8个直接与唾液酸接触，包括R118、D151、R152、R224、E276、R292、R371和Y406。11个氨基酸组成了催化残基的框架，包括E119、R156、W178、S179、D198、I222、E227、H274、E277、N294和E425[235-236]。

NA抑制剂是唾液酸类似物，能竞争性抑制NA，对人类和禽流感病毒株，包括流感病毒B型及已鉴定的9种禽流感病毒A的NA亚型都具有活性[224,236-237]。尽管NA抑制剂对流感病毒B的活性天然低于流感病毒A，但在临床试验中使用NA抑制剂对流感病毒B也是有效的[224]。奥司他韦是一种口服药物，其含大侧链的唾液酸碳环类似物结构能促使NA的构象发生有利于结合的改变[234]。由于扎那米韦是喷雾剂处方药，与奥司他韦相比，其与唾液酸的自然结构更相似，扎那米韦耐药发生的概率明显低于奥司他韦[237]。在美国，尽管帕拉米韦尚未被批准用于严重流感这一特殊适应证，但静脉注射的帕拉米韦制剂能成为严重流感感染的合适的抗病毒药物[226]。

引起NAI耐药的NA突变随流感病毒型别(A或B)及流感病毒A的亚型(如N1或N2)而异(表114-5)。此外，在流感病毒A亚型中特异性的遗传谱系对于NAI的敏感性及NAI耐药突变的倾向性也有所不同。因此，进行基因型和表型耐药的监测可用来确定流行NA变异株固有敏感性和复制能力的变化，以及接受NAIs治疗的患者选

择出的耐药突变谱。

NAI的敏感性检测主要包括基因型和NA酶抑制试验[238-239]。基因型检测对于临床管理和监测均有意义[239]。NA酶抑制试验用于监测及确定新NA变异株的特点。细胞培养试验是可行的,但需谨慎解读,因为用于培养的细胞具有不同浓度的糖聚合物受体,不同的流感病毒对NA活性的依赖性也不相同[240-241]。

在使用奥司他韦最初几年中,有报道在接受治疗的成人中有1%~4%出现耐药,儿童耐药比例更高[242-243]。尚无证据表明奥司他韦存在天然耐药,也无关于传播性耐药的报道[244]。在2007—2008年的流感季,导致全球H1N1感染的主要毒株带有对奥司他韦耐药的可读框突变H274Y[245-246]。到2008—2009年的流感季,在美国和欧洲超过95%的季节性H1N1病毒对奥司他韦耐药[245,247]。随着2009年导致大流行病毒的出现,这种毒株消失了,免疫能力正常的人群的耐药性水平恢复到1%~2%[248]。

H274Y突变使奥司他韦的敏感性下降几百倍至几千倍,并引起帕拉米韦的高度交叉耐药,但不影响扎那米韦[244]。虽然体外细胞培养试验和雪貂模型实验均表明,H274Y突变使旧的病毒复制能力显著降低[249],但2006—2007年出现的含有H274Y突变的H1N1病毒保持了其复制能力、传播性和致病性[250]。流行病学和分子系统进化数据表明,2007—2008年H1N1毒株的H274Y固定突变并非药物选择压力的结果[251],而是自2007—2008年流行的季节性H1N1毒株进化而来,或者是特异性地补偿了该亚型毒株其他"允许"突变,可能是R221Q、V233M和D343N[234,252]。反向遗传学和诱变实验进一步证实了在A/Brisbane/579/2007(H1N1)中,对于恢复H274Y突变带来的敏感性降低的影响,R221Q变化有主要的允许作用[253-254]。

H274Y是接受奥司他韦治疗的患者中出现频率最高的NAI耐药突变[255],在2011年澳大利亚[256]和2014年日本[257]A型(H1N1)pdm09毒株中广泛聚集成簇。尽管H5N1病毒对奥司他韦和扎那米韦天然敏感[258-259],但由H274Y突变导致抗病毒治疗失败,比2007年前接受奥司他韦治疗的季节性H1N1和A(H1N1)pdm09感染者的失败比例高[260]。

在A(H1N1)或者A(H1N1)pdm09亚型中,NAI其他突变包括Q136K、Y155H、I222M/K/R/V、S246N/G和N294S[237,261-262]。I222和S246突变可以提高含有H274Y突变病毒的复制适应性,其单独出现时,只会导致毒株对奥司他韦和扎那米韦的低度耐药(5~30倍的敏感性降低)[261-262]。Q136K和Y155H是罕见的NI天然突变,使扎那米韦(Q136K)、奥司他韦及扎那米韦(Y155H)的敏感性下降30倍以上[241,263]。Q136K在原代临床标本中较少存在,但细胞培养中的比例有所上升,该突变的临床意义遭到质疑[263-264]。最近的临床研究报道,发生E119G/D突变可引起所有被测试的NA抑制剂发生交叉耐药[265-266]。

在接受奥司他韦治疗的H3N2病毒感染者中会出现催化和骨架替代突变R292K、E119I/V、N294S和Del245-248缺失[237,243,255,267-268]。E119I和E119V使奥司他韦的敏感性下降30倍以上,并引起扎那米韦低度交叉耐药(E119I)(表114-5)。R292K和N294S导致对奥司他韦的高度耐药,以及对扎那米韦低度交叉耐药。有报道在接受奥司他韦治疗的H7N9患者中发现R292K、E199V和I222K/R突变[269-270]。

在流感病毒B中,已报道最常见的NAI耐药突变包括:D198E/N、I222T、R152K及R371K。D198N和I222T使病毒对奥司他韦和扎那米韦敏感性下降在10倍以内[224]。在2004—2008年的一个监测研究中确定的,R371K突变可使病毒对奥司他韦敏感性下降100倍以上,对扎那米韦敏感性下降30倍左右[246]。有报道称在免疫力低下且长期吸入扎那米韦治疗的患者中检出了R152K突变,可引起病毒对奥司他韦和扎那米韦高度耐药[271]。近期,WHO委员会根据病毒类型确定了NAI耐药水平。对于流感病毒A,通过NA分析,其IC_{50}水平增加10~100倍为抑制减弱,而抑制高度减弱至少增加100倍以上。对于流感病毒B,其IC_{50}水平增加5~50倍被定义为抑制减弱,而增加50倍以上被定义为抑制高度减弱[272]。值得注意的是,目前,仅明确了H1N1病毒中的H274Y突变与临床药物失败有关[273]。

参考文献请扫二维码查阅

第115章 抗病毒药物敏感性试验方法

DIANA D. HUANG, BENJAMIN A. PINSKY, MATTHEW J. BANKOWSKI

（王大燕 译；侯铁英、宁永忠、汤一苇 审校）

美国FDA批准的部分抗病毒药物已有市售，并用于1型和2型单纯疱疹病毒(herpes simplex virus types 1 and 2, HSV-1和HSV-2)、人巨噬细胞病毒(human cytomegalovirus, HCMV)、水痘-带状疱疹病毒(varicella-zoster virus, VZV)、人类免疫缺陷病毒1型(human immunodeficiency virus 1, HIV-1)[1]、乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)、丙型肝炎病毒(hepatitis C virus, HCV)[2-3]和流感病毒感染的治疗和处置。当长时间和(或)间歇使用这些抗病毒药物时，变异株可能会被选择出来成为"耐药株"，导致病毒对治疗药物不再敏感[4-11]。由于这些变异株具有传染性，因此了解病毒耐药情况对于制定治疗方案至关重要[12]。

为了让患者获得最佳的治疗需要进行病毒感染的监控，而目前这方面的标准做法是进行病毒的敏感性检测。在过去的10年中，唯一被FDA批准的可用于病毒药敏检测的是以HIV-1蛋白酶(Pro)和逆转录(RT)基因为靶标的检测试剂。不过，其他病毒的药敏检测正受到越来越多的关注，例如，HBV、HCV和HIV-1病毒，针对这些病毒有新获批的抗病毒药物。在实验室自建方法(laboratory-developed test, LDTs)中，病毒药敏测试可采用研究专用(research-use-only, RUO)检测试剂盒或分析物特异试剂(analyte-specific reagents)来开展相关检测[13]。

一、抗病毒药物耐药和药物治疗失败的原因

药物治疗失败的原因有多种。比较常见的是被治疗的病毒对治疗的药物存在天然耐药，另外，宿主的生物学因素和社会行为因素(如治疗的依从性差)也可能影响治疗的成功率。病毒的药敏试验可鉴定耐药的病毒并指导临床治疗。

(一)真正的抗病毒药物耐药

抗病毒药物耐药是指药物抑制病毒复制的效率降低。临床上耐药的表现是：即使对被感染个体进行积极的治疗，患者体内循环病毒载量仍然增加或不发生改变。这种药物敏感性的缺失可通过体外实验进行检测，这种检测可评估病毒—药物结合物的表型活性。如果抗病毒药物的效果下降与病毒基因上的特异位点突变有关(影响了药物对靶蛋白的功能)，那么病毒对这种药物产生的耐药性有可能成为病毒自身固有的、可传播的特征。病毒基因型和表型的表达为抗病毒药物活性的缺失提供了双重依据并记录在药物研发档案中。这些相关性可通过对病毒(分离自临床药物试验的受试者)进行抗病毒检测进行独立确认。可以研发一些诊断方法，检测病毒对药物反应的改变和(或)鉴定出与药物敏感性下降相关的特异性突变的存在。这些试验数据的解读可用于临床上对病毒感染的管控。

(二)宿主因素

即使感染机体的病毒的药物敏感性相关位点没有发生任何突变，药物治疗也有可能会失败。宿主的生理因素会干扰临床治疗反应，宿主的遗传背景也可能降低药物作用，因为宿主的基因多态性(例如，*IL28b*基因)可能会影响聚乙二醇干扰素(pegylated-interferon, peg-IFN)——利巴韦林对HCV治疗的活性或生物利用度[14-16]。其他非病毒因素包括潜在的药物—药物之间的相互作用，如在新蛋白酶抑制剂治疗慢性HCV感染的早

期临床试验中发现，在HIV-HCV共同感染的个体中，一些HIV-1蛋白酶治疗药物发生药物间相互作用和药代动力学影响[17]。同时服用HCV和HIV蛋白酶抑制剂可引起其中的任何一种病毒的载量升高[18]。在这种情况下，病毒基因上并没有产生与耐药相关的位点突变。

(三)患者社会行为影响

因为各种各样的原因，患者在接受药物治疗过程中可能没有遵照医嘱服药。例如，在抗逆转录病毒药物和干扰素(IFN)治疗时，患者可能会在生理、心理方面出现不良反应，加剧患者对药物的不耐受。而急性、长期的病症及复杂的治疗过程(如药物负担和用药时间)都可能影响患者服药的依从性[19]，因此，患者可能会按照自己的意愿暂停治疗。此外，从社会经济角度考虑，对某些患者来说，坚持按照治疗方案给药可能很困难[20]，而这种治疗缺口的存在可能会促进具有潜在遗传耐药性的病毒群的产生或选择。对于这类患者，如果病毒变成耐药株，那么在以后的治疗中这类药就不再有效[21]。现在越来越多的临床试验和研究正在开展对依从性[22-24]和包括基因型在内的病毒耐药性检测的工作。

二、抗病毒敏感性检测的临床指征

当真正发生抗病毒耐药(如患者感染病毒发生遗传改变)时，这种抗病毒药物的治疗不能产生有效的应答，这时候注意区别是临床耐药还是病毒耐药是很重要的。当一种特殊的抗病毒药物发生临床耐药时可能会误解成病毒耐药。当不能识别出这种差异时，将导致更多有不良反应的药物的不合理使用，从而引起更高的发病率、死亡率及更高的检测成本。例如，免疫抑制的移植患者在抗病毒药物治疗的前几周可能显示CMV病毒载量增加。这种升高不太可能是由于药物产生耐药性，因为CMV不常在治疗的最初6周内获得耐药性[25]。

在考虑是否进行抗病毒药物耐药性检测时，患者的临床分类和状态是非常重要的。表115-1中，列举了免疫正常患者和免疫功能低下患者应该考虑进行抗病毒药物耐药性检测的指征。一般而言，如果病毒载量维持不变或持续增高并伴随临床症状的不断恶化，这是出现了病毒耐药的可靠指征。如果出现这些耐药信号，应当直接做病毒耐药性试验。抗病毒药物敏感性试验方法可以是表型或基因型检测，这要根据待检测特异性病毒的情况来进行选择。对那些联合用药治疗的个体在检测数据的解释上会更加复杂。

三、检测方法：表型检测

(一)噬斑减少试验和染料吸收试验

抗病毒药物药敏性检测的标准方法是噬斑减少试验(plaque reduction assay，PRA)，如图115-1所示。PRA试验的原理是在预设的药物浓度中，抗病毒药物可以抑制病毒噬斑的形成。计算50%抑制浓度(inhibitory concentration，IC_{50})并以每毫升(ml)或微摩尔(μmol)单位中的药物含量(μg)进行报告。若样本毒株的IC_{50}值高于野生型对照株，这表示该毒株可能对该药物耐药。对不同病毒株，药物的IC_{50}值可能不同。这种方法对疱疹病毒(如HSV、CMV和VZV)特别有用，但是非常耗时，HSV的PRA检测周期为2～3天，VZV的周期约为7天，CMV的周期至少为1个月[26-29]。

表115-1 可能需要进行抗病毒药物耐药检测的临床表现

临床分类	临床状态	耐药的指标
免疫功能正常的宿主(如流感病毒或生殖道HSV感染)	培养或分子检测提示病毒感染及具有短期抗病毒治疗史	维持现有的治疗方案，但病毒培养结果持续阳性 通过定量分子生物学检测，发现病毒载量不变或升高 无其他病原感染的证据但临床症状不断恶化 出现抗病毒耐药性的流行病学依据(如甲型流感病毒对奥司他韦耐药)
免疫功能低下的宿主(如由癌症、移植或艾滋病导致的免疫抑制)	长期的抗病毒药物治疗或基于预防或治疗为目的的联合治疗	当具有长期抗病毒药物治疗史和抗病毒治疗失败史时，出现病毒血症或病毒载量升高；难以解释原因的临床疾病症状恶化 与特定抗病毒药物出现已知的交叉耐药反应(如HIV-1抗逆转录酶治疗) 降低病毒载量效果欠佳(如更换HIV-1治疗方法即使进行基线重新测试也未成功)

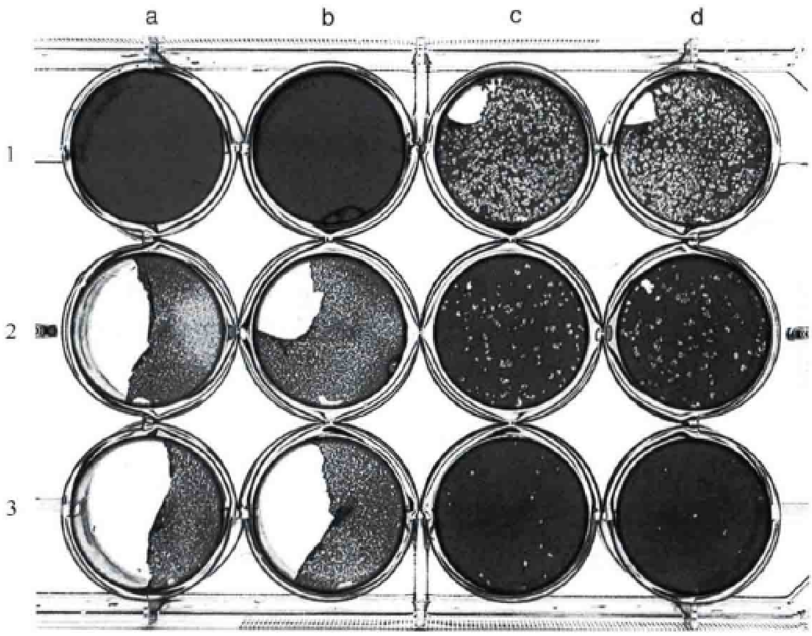


图 115-1 用于确定 HSV-1 阿昔洛韦耐药的 PRA（即表型测试）示例。从前两孔（1a 和 1b）未感染细胞开始，显示了通过复孔检测的对阿昔洛韦敏感的 HSV-1 分离株噬斑数量的减少。从 2a 和 2b 开始，将阿昔洛韦浓度递增向下添加至连续孔中，继续至 3a 和 3b，并从 12 孔微量滴定板的右上方向下移动（1c/1d 至 3c/3d）。最低噬斑数出现在 3c 和 3d 孔，其加入了最高浓度的阿昔洛韦，见彩插

PRA 采用两步法检测。第一步是使临床分离株在易感细胞中生长，以获得可确定其感染力滴度的病毒原液。对于生长较慢的病毒（如 CMV），这一过程可能需要 3～4 周。病毒原液的滴定是通过噬斑法进行梯度稀释，从而对感染病毒颗粒的相对数量进行定量测量，这个过程对于 CMV 病毒大约需要 10 天。

第二步是使用 PRA 确定病毒对抗病毒药物的敏感性。也就是将已知数量（如 100 个）的感染性病毒颗粒加入经系列稀释的抗病毒药物的溶液中进行孵育。如果病毒对这种药物敏感，则随着药物浓度的增加，噬斑的数量将减少。与药物空白对照孔进行比较，通过最小噬斑减少法明确病毒的耐药性。PRA 检测 CMV 病毒可能会在试验中额外增加 10 天，因此评估该病毒药物耐药性的总时间可能需要 4～6 周[25]。对于生长快速的病毒（如 HSV），花费的时间会少一些。

这种方法还有一个问题就是方法的标准化，由 CLSI 推荐的针对 HSV 的标准文件目前已经出版（M33A）。目前，仍然推荐表型检测法（如 PRA）进行检测，这是因为在疱疹病毒中，有很多未知的突变会导致病毒对药物的耐药性。表 115-2 详细罗列了采用 PRA 法检测疱疹病毒和甲型流感病毒抗病毒药敏试验结果解释的推荐指南。

表 115-2 疱疹病毒和甲型流感病毒抗病毒药敏表型试验结果的拟议指南（Proposed guidelines）

病毒	抗病毒药物	方法	IC_{50} 值（提示耐药）	参考文献
单纯疱疹病毒	阿昔洛韦	PRA	≥2 μg/ml	29
		DNA 杂交 DU	≥2 μg/ml	9,143
		PRA	≥3 μg/ml	29,144
	泛昔洛韦（活性代谢物 5 喷昔洛韦）	PRA 和 DNA 杂交	不能建立明确的界值	145,166
	膦甲酸	PRA	＞100 μg/ml	147

（续 表）

病毒	抗病毒药物	方法	IC_{50} 值(提示耐药)	参考文献
	阿糖腺苷	PRA	IC_{50} 增加 2 倍以上(与对照株或治疗前分离株相比)	148
人巨细胞病毒	西多呋韦	PRA 和 DNA 杂交	>2 μM	62-64
	膦甲酸	PRA 和 DNA 杂交	>400 μM	63,149
			>324 μM	64
	更昔洛韦	PRA 和 DNA 杂交	IC_{50} 增加 3～4 倍以上(与对照株或治疗前分离株相比)(约 3 μg/ml)	70,150,151
			>6 μM	62,63
			>8 μM	64
甲型流感病毒	金刚烷氨/金刚乙氨	EIA	>0.1 μg/ml	5,6
甲型和乙型流感病毒	奥司他韦和扎那米韦	NI 试验	NA 活性下降 8 倍以上	128,152
水痘-带状疱疹病毒	阿昔洛韦	PRA 和 DNA 杂交	IC_{50} 值下降 3～4 倍以上(与对照株或治疗前分离株相比)	26,153,154
	泛昔洛韦	PRA 和 DNA 杂交	不能建立明确的界值	166
	膦甲酸	晚期抗原减少试验	300 μM	154

染料吸收(dye uptake,DU)试验是根据活细胞可以吸收中性红染料的特性进行检测的[29]。它可用于 HSV 抗病毒药物敏感性检测。IC_{50} 值的计算方法与 PRA 法相似，但采用比色法进行测量。

(二)酶联免疫法

酶联免疫法(enzyme immunoassays,EIAs)已用于抗病毒药物敏感性检测[5-7,30-32]。这类方法已成功地用于疱疹病毒和甲型流感病毒检测，检测性能可与 PRA 法相媲美，但具有工作量更小、可定量检测的优点。它可通过测定吸光度(与病毒感染细胞中的病毒抗原相关)确定 IC_{50} 值。

(三)神经氨酸酶抑制试验

FDA 共批准了 3 种神经氨酸酶(NA 或 N)抑制剂(neuraminidase inhibitors,NIs)(奥司他韦、扎那米韦和帕拉米韦)用于治疗甲型和乙型流感病毒感染[33]。一种可以得到 IC_{50} 值的荧光检测法已开发并成功用于上述 3 种神经氨酸酶抑制剂药物的抗病毒药敏试验中[34-35]。随后检测方法已经商品化，可购买相关试剂盒[NA-Star 或 NA-XTD(Applied Biosystems,Foster City,CA)]。一种基于生物发光的快速测定法可在一次测试中检测甲型和乙型流感病毒及其神经氨酸酶对奥司他韦和扎那米韦的敏感性[36]。该检测试剂盒带有 CE 标记，在美国可作为 RUO 试剂盒进行购买。

(四)重组病毒试验

用于药物敏感性检测的重组病毒试验(recombinant virus assay,RVA)已用于临床。在抗病毒药物作用下，RVA 可以对病毒的表型特点进行检测，这有助于发现病毒基因组中与病毒耐药相关的突变基因。首次应用于临床的 RVA 法是用于检测 HIV-1 病毒对蛋白酶和逆转录酶抑制剂的表型耐药性。

RVA 的操作策略是直接对患者样本中病毒的目的基因(例如，HIV-1 蛋白酶基因或逆转录基因)进行 PCR 扩增。然后，将 PCR 产物嵌合到已敲除蛋白酶或逆转录酶基因的逆转录病毒载体中。来自患者的病毒基因通过嵌合，恢复蛋白酶或逆转录酶的活性。载体上同时含有 env 基因，可以编码受体结合蛋白，其被编码发光基团蛋白的报告基因取代(如荧光素酶)。这种载体，已经嵌合了(来自患者的毒株的)HIV-1 目的基因，与其他种类的质粒共同转染敏感细胞株。这些嵌合了非 HIV 受体结合蛋白基因的质粒可以吸附和感染受试细胞。转染以后，新组装的嵌合病毒被称之为假病毒，包含非 HIV 受体结合蛋白、逆转录病毒载体中来自患者所携带病毒的 HIV-1 蛋白酶或逆转录酶基因，以及报告基因。假病毒可以感染特定的细胞并启动单个复制周期。在加入抗逆转录药物时，RVA 方法可以利用细胞检测 HIV 患者的病毒蛋白酶或逆转录酶

的活性。只有在病毒成功复制的情况下，可以通过监测表达细胞中荧光素酶的发光信号，来测定假病毒的复制效率。如果包含蛋白酶或逆转录酶的假病毒对抗病毒药物敏感，它们在感染细胞中将不发出光信号，相反，若对药物耐药，则发出可测量的光信号。

RVA 方法工作强度大，耗时长，需要很长周期。RVA 利用细胞培养方法。使用标准细胞系可确保试验的一致性，而使用原代细胞（如外周血单个核细胞）是无法实现的。与传统培养方法相比，RVA 方法的优势在于，可以得到药物抗病毒活性与患者所携带病毒特异性基因之间的直接证据。同时，如果 RVA 方法显示病毒的基因分型与已知的耐药突变关联，可以检测到耐药的表型与基因型呈正相关，尤其是应用于那些接受过多种药物治疗的患者。这些信息有助于更准确地了解患者 HIV-1 耐药的实质，以便在需要改变治疗方案时，为临床医生在可用的抗逆转录病毒药物中作出更准确的选择。

现已对 RVA 法进行了改进，在将 HIV-1 活性抑制剂作为备选用于患者抗病毒治疗时，改进了的方法可以监测融合、整合酶和共同受体的使用。目前，商业化的参比实验室提供 HIV-1 RVA 检测。利用 RVA 可有效检测 HIV-1 蛋白酶-逆转录酶、融合、整合酶及共同受体活性。也有基于这种策略的 LDT 演变方法，用于检测 CMV 的耐药试验，这项实验可以将 CMV 的基因型和表型数据关联起来[37]。

四、检测方法：基因分析

抗病毒基因检测靶向基因及其突变位点见表 115-3 和表 115-4。目前有 43 种药物可用于治疗 HIV-1，它们的作用靶点是蛋白酶、逆转录酶、整合酶、病毒融合及病毒进入过程[38-39]。已知的与病毒耐药相关的突变和新批准的抑制剂的列表每 2 年更新 1 次。目前的列表可以从国际抗病毒协会-美国网站（http://www.iasusa.org/sites/default/files/tam/24-4-132.pdf）下载，也可以从斯坦福 HIV 耐药数据库中下载（http://hivdb.stanford.edu）。对基因突变的理解是识别耐药基因型的基础。对原始的 Sanger 测序法基因序列数据进行分析时，最终对结果的处理和解释会因人而异。需要专门的培训和经验，来正确识别模板中的相关突变。Sanger 法基因检测的基本流程见图 115-2。商业化参比实验室和大型医疗中心可提供高度复杂的 FDA 批准/准许的试验或实验室自建程序（LDT）。一个基本报告通常包括耐药相关突变位点和对突变位点的解释。小型的诊断实验室如果经过良好的培训并具有设备，也可以进行抗病毒基因分析。但是，对于任何规模的实验室，都需要严格控制结果的生成，并对数据进行准确正确的解释。下一代测序（NGS）代表的较新平台通常是 LDT 协议。目前尚无经 FDA 批准和准许的用于分析抗病毒药物耐药性突变的分析方法。由于分析方法尚未标准化，因此尚未制定出这些方法和分析的统一的指南。

表 115-3 用于抗病毒耐药检测基因分析方法的基因靶点

	病毒组	抗病毒试剂	基因靶位	基因突变	参考文献
疱疹病毒	巨细胞病毒（CMV）	西多呋韦	UL54	见表 115-4	见表 115-4
		膦甲酸	UL54		
		更昔洛韦	UL54，UL97		
		马立巴韦	UL97		
		缬更昔洛韦	UL54，UL97		
	单纯疱疹病毒（HSV）	阿昔洛韦 伐昔洛韦 泛昔洛韦	TK 和（或）DNA 聚合酶	P57H，D59P，K62N，R51W，E83K，插入，核苷酸替换	145，155-166
		膦甲酸	DNA 聚合酶	Regions Ⅱ，Ⅲ，and Ⅵ	
		西多呋韦	DNA 聚合酶	Regions δC and Ⅱ	

（续 表）

	病毒组	抗病毒试剂	基因靶位	基因突变	参考文献
	水痘-带状疱疹病毒(VZV)	阿昔洛韦 伐昔洛韦 喷昔洛韦 泛昔洛韦	TK 和(或) DNA 聚合酶	移码和碱基替换	164,167,168
		膦甲酸	DNA 聚合酶	Regions Ⅱ,Ⅲ,和 Ⅵ	
		西多呋韦	DNA 聚合酶	非特异	
流感病毒	甲型流感病毒	金刚烷胺	M2 蛋白	26,27,30,31,34	5,6,152,169-174
		金刚烷乙胺	M2 蛋白	26,27,30,31,34	
		奥司他韦	NA	H275Y,E119V,R292K,N294S	
		扎那米韦	NA	T198I,R152K	
	乙型流感病毒	奥司他韦	NA	R152K	
		扎那米韦	NA	R152K	
肝炎病毒	乙型肝炎病毒(HBV)	阿德福韦	Pol RT(B,D)	rtA181TV,rtN236T	175-194
		恩替卡韦	Pol RT(A,B,C,E)	rtI169T, rtV173L, rtL180M, rtT184G/S/A/I/L, rtM204V/I, rtS202G/C/I, rtM250I/V	
		拉米夫定	Pol rt(A,B,C)	rtL80V/I,rtL180M,rtM204V/I/S/A	
		替比夫定	Pol rt(A,B,C)	RtL80V/I,rtL180M,rtM204V/I/S/A	
		替诺福韦	Pol rt(B,C,D)	RtL180M,rtM204V,rtN236T	
	丙型肝炎病毒	达卡他韦,索非布韦	NS5A/NS5B	NS5A GT1a M28A/G/T, Q30D/E/H/G/K/L/R,L31F/M/V,Y93C/H/N/S	109
		格拉佐普列韦(elbasvi)	NS3/4A/NS5A	NS5A GT1a M28A/G/T,	
		来昔巴韦,索非布韦	NS5A/NS5B	Q30D/E/H/G/K/L/R,L31F/	
		paritaprevir, ombitasvir,利托那韦	NS3/4A/NS5A/NS5B/CYP3A	M/V,Y93C/H/N/S	
		舒美布韦,索非布韦	NS3/4A/NS5B	Q80K	
		特拉普韦,peg-IFN, ribavirin	NS3/4A	V36C,R155K,A156T/V	
		velpatasvir,索非布韦	NS5A/NS5B		
		voxilaprevir, velpatasvir,索非布韦	NS3/4A/NS5A/NS5B		

表 115-4 CMV UL54 和 UL97 的基因靶点及相关抗病毒药物耐药突变[a]

基因片段	基因区域与突变[b]	CMV 敏感性[c]		
		西多福韦	膦甲酸	更昔洛韦
UL97(磷酸转移酶)	M460V, M460I, H520Q, Del591-594, A594V, L595S, L595F, Del595, C603W, C607Y	NA	NA	R
其他与更昔洛韦耐药有关、在 UL97 或邻近 UL97 密码子的突变	N510S, A590T, A591D, A591V, C592G, A594T, L595T, L595W, E596G, N597I, G598V, K599M, Del600, C603Y, C606D	NA	NA	R
UL54(DNA 聚合酶)[d]	N408D, D413E, **L501F**, L501I, T503I, P522S, L545S, G678S, I722V, Y751H, A809V, **A987G**	R	S	R
	F412V, **F412C**, K805Q, K513R, K513E	R	S 或 R	R
	P522A, G841A	ND	S	R

（续　表）

基因片段	基因区域与突变[b]	CMV 敏感性[c]		
		西多福韦	膦甲酸	更昔洛韦
	D588E、**L802M**	S 或 R	R	S 或 R
	T700A	S	R(S)[e]	S
	V715M	S	R	S
	V781I	S	R	R
	T821I	R	R	R

注：[a] 参考文献[25][60][149]和[195-204]。[b] 粗体表示该耐药位点是通过重组病毒证实。[c] S. 敏感；R. 耐药；NA. UL97 不是该药物的靶点；ND. 未确定或目前未知的表型；[d] 大多数 UL54 突变株同时有 UL97 突变(UL54 例外)；[e] 发现的唯一一有该突变的膦甲酸-敏感株

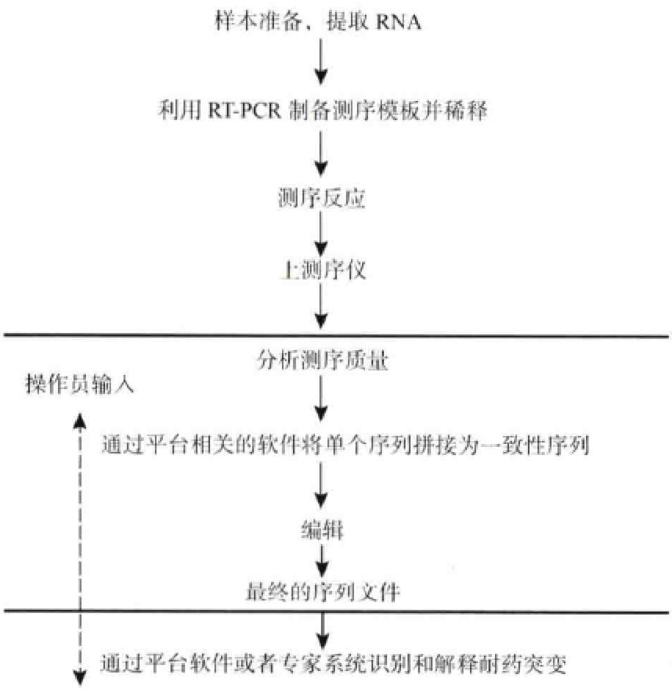


图 115-2　血浆样本基于 Sanger 法基因分析的一般操作流程。具体操作步骤如上图所示。第一条线以上的步骤是需要专门的操作指导和仪器来完成的部分。这一步完成后，由操作者通过能够接受测序仪色谱信号的软件系统来完成。操作者选择包含未知突变的参考序列，将其导入软件。然后进行序列比对、编辑，并找出患者样本序列中的突变位点。HIV-1 最常用的一致性序列是 HXB2 株和 HIV-1 B。如果操作者用自行设计方法对其他病毒进行基因型分析，则需要根据文献或"常用方法"来选择参考序列

(一)基因型检测平台(genotypic platforms)

用于抗病毒敏感性试验的基因分型平台包括 Sanger 测序、焦磷酸测序、下一代测序、体外逆转录杂交线性探针试验(line probe assay，LiPA)、单核苷酸多态性(single-nucleotide polymorphism，SNP)分析。对等位基因做实时荧光定量 RT-PCR 也是一种针对单个位点突变的 LDT 方法[40-41]。与表型分析法相比，基因型分析法一般能更快捷的得到结果，并且花费更少。目前，测序法更常应用于检测明确与耐药相关的突变。它也可以识别出与病毒耐药相关的新突变。但是，大多数测序平台都需要使用生物信息软件来准确进行数据解释。

对于有多个、聚集性耐药突变的病毒基因组，主要利用 Sanger 双脱氧测序方法对其进行分析[42]。例如，HIV-1 或 HCV 慢性感染，由多个变异毒株构成的病毒种群被称为"准种"[43]。Sanger 测序法得到的原始数据通过色谱图显示，在序列中可以显示出总病毒群中的较少的毒株群。操作人员需要对图谱进行分析并手动校正数据，以确保图谱质量是可以接受的(图 115-2)[44]。任何一致性序列均应该同时包括由正向和反向 PCR 扩增所得的序列，需要在两条链上的序列都具有相同的突变，才能确保序列的准确性。排除测序过程导致的人为误差(如酶校读过程产生的缺口，或者在准备测序样品过程中的不一致)，这一过程可以识别出真正的核苷酸变化。Sanger 测序法对于检测基因组当中那些较长的连续的区域非常有用。高质量测序反应中，如果测序模板是单一的干净的 PCR 产物，每个测序引物可以获得 600～700 个准确碱基读长。但是，当劣势株的比例小于约 20%时，Sanger 测序法检测到混合病毒群中的变种的重复性不佳。

焦磷酸测序是确定与病毒耐药相关的突变位点的另外一种测序方法。Sanger 测序法与焦磷酸测序法之间在几个方面有本质的差异，Metzker 已经进行了深入阐述[45]。焦磷酸测序方法目前尚未获得 FDA 批准或批准用于抗病

毒药敏试验。

下一代测序(next-generation sequencing,NGS,也称大规模平行测序(massively parallel sequencing,MPS)技术的引入,可以进一步阐述基因序列的潜能,并且可以检测到含量在1%~5%、在某些情况下小于1%的劣势株群。由于它可以得到大量的基因组序列读长,这种“超深度测序”可以检测到混合样本中更低水平的变异株[46]。这些技术,也称为超深、高通量或大规模平行测序,由于扩增的克隆或单分子的平行测序获得的基因组读长数量众多,因此可以检测到混合样品中含量较低的变体。这些有价值的序列数据提供了患者中感染因子种群的特征。NGS还可以对用Sanger测序可能误读的变体进行准确验证。尽管NGS技术发展迅速,但是目前用于基因型抗病毒耐药性测试的NGS方法通常使用靶向PCR扩增来富集目标耐药性基因序列。另外,测序文库的制备涉及添加平台特异性的衔接子序列和序列条形码以进行多重检测,并产生适当大小的待测序片段或扩增子。目前,NGS产生的序列数据长度为150~300个碱基。解释大量原始序列数据具有挑战性,需要实验室将数据放入生物信息学通路中进行分析和比对,以鉴定临床样品中存在的序列变异[47]。一旦识别出变体,就应该使用药物耐药性突变数据库来进行解释,这种数据库考虑了其与表型、治疗和临床转归的关系,以及它们之间的相互作用(如果已知)。随着文库制备技术、测序方法、生物信息学方法和耐药性数据库的改进及整个过程越来越普遍的自动化,NGS可能会成为诊断和管理病毒耐药性的重要工具[47]。实验室实施NGS技术,仍然存在许多悬而未决的问题,包括有关低水平耐药性突变的临床影响及突变报告的阈值问题。

LipA药物敏感性检测方法是通过PCR手段,扩增来自患者的病毒目的基因,产生生物素标记的寡核苷酸。随后将扩增产物与结合到硝酸纤维素膜条上的寡核苷酸探针进行杂交,探针是空间嵌入到硝酸纤维素膜条这个固相介质的。探针是根据参考病毒的基因组设计的,包含耐药相关的单个突变位点。参考序列的探针和突变序列的探针都嵌入在膜结构上。每个要鉴定的单个突变由不同的探针来识别。探针在硝酸纤维素膜条上的反应模式(即由EIA过程产生的颜色反应)说明来自患者的病毒种群存在的突变。LiPA反应只能检测已知的、之前已经识别的突变,这些突变的特异性与检测试剂盒中包含的探针是一致的[48]。目前,LiPA也不是FDA批准/核准的用于检测药物抗病毒敏感性的方法。

实时PCR(Real-time PCR)和SNP法也可用于抗病毒药物敏感性检测。特别是用于甲型流感病毒对神经氨酸酶抑制剂类药物的敏感性检测[49-50]。SNP试验是多重的,因此,在每个反应中可加入多对引物/探针。探针可以区分野生型毒株和携带了耐药突变的变异株。不同探针用不同荧光染料标记,通过检测结合的染料可以指示是否存在突变。这些方法大多数是LDT(使用分析物专用试剂),大型商业化参比实验室更可能开展这些检测。

(二)应用(基因分型)

1. 疱疹病毒

(1)人巨细胞病毒(HCMV):目前,尚没有用于HCMV耐药突变位点筛查的由FDA核准/批准的试剂盒/系统或RUO试剂盒。目前,用Sanger测序法来筛查HCMV针对更昔洛韦的耐药突变,以及筛查对治疗CMV的新型药物(如来特莫韦)的耐药性[51-53]。直接对血样、脑脊液及细胞培养物中的HCMV进行测序,也已经成功地用于确定对药物的耐药性[54-56]。NGS方法也已用于HCMV耐药性的诊断,并且与Sanger测序相比,提高了检测低水平变异的敏感性[57-58]。基因型分析比表型分析更快捷,目前基因分析法已经成为检测患者标本中HCMV的耐药情况的首要选择,可检测的最低病毒载量(viral load,VL)为1000 copies/ml[59]。

HCMV的UL97(磷酸转移酶)和UL54(DNA聚合酶)基因是有据可查、含有大量的耐药突变(表115-3和表115-4)的靶基因[60]。通过对UL97全长基因,包括磷酸转移酶活性相关的保守区域进行测序,可以确定所有对更昔洛韦耐药的相关突变[25,61-64]。尽管如此,仍不断发现新的与抗病毒药物敏感性相关的突变,特别是在免疫功能低下的人群中(如器官移植患者)[53,65-66]。长期以来,一直认为UL97的突变会影响病毒对更昔洛韦的耐药性[64,67-68]。UL54突变与病毒对更昔洛韦、膦甲酸、西多福韦(密码子300~1000)的耐

药有关[60-69]。对 *UL54* 和 *UL97* 基因进行测序时需要多对引物生成多个 PCR 扩增产物，会增加实验的成本和复杂性。这些原因及由于个别机构的测试数量有限，这种实验通常由大型学术医疗中心或商业化参比实验室完成。

HCMV 的耐药基因的序列在解释时必须非常小心，因为基因上的有些常见突变可能不会引起表型上的耐药。例如，在 UL97 上中等数量的密码子的突变与其抗病毒药物耐药性无关[63]。如果没有文献支持或者临床药物效果无法获得[60,62,70]，检测实验室应当利用通过“重组表型”识别法来确定这些突变[25]。在给定突变的重复测定中，突变体与野生型的 IC_{50} 比率最高可波动 30%，但 UL97 中耐药性比率通常至少为 2[25]。在这种情况下，需要考虑用前述提到的 HCMV 的重组分析[37]。

(2)单纯疱疹病毒 1 型和 2 型(HSV-1 和 HSV-2)：目前可用的治疗 HSV 感染的抗病毒药物有阿昔洛韦(ACV)、喷昔洛韦(PCV)及它们的前体药物(伐昔洛韦和泛昔洛韦)(表 115-3)。这些药物的作用靶点是 HSV 的胸苷激酶(TK)和 DNA 聚合酶(Pol)。HSV 耐药株常常是在被 HSV 感染的免疫功能缺陷的患者中形成的。对这部分人群来说，对其进行抗病毒药物敏感性试验尤为重要(表 115-1)。

通常选择 HSV 的 TK(UL23)和 DNA 聚合酶基因作为基因型测序的目的基因，这 2 个基因与 ACV 和 PCV 耐药有关[71]。很多情况下，ACV 耐药与 *UL23* 基因突变相关，特别在鸟嘌呤和胞嘧啶重复区域，存在高突变[72-73]。相反，临床样本分离株在 *UL30* 基因的突变则分散于 Ⅱ、Ⅱ、Ⅵ和Ⅶ各结构域[71]。

在 ACV 和 PCV 治疗无效且排除了其他引起药物治疗失败的原因后，需要考虑进行抗病毒药物表型敏感性实验。HSV 一般不要求进行基因分型，也没有专门针对耐药突变位点进行解释的指南。因此，为了从病毒的多态性中区分出真正的耐药位点，通常将所得的突变结果与已发表文献中的突变位点进行比较[70]。

(3)水痘-带状疱疹(VZV)：在 VZV 感染的患者中，若患者是免疫功能低下患者(例如，HIV 感染、移植和癌症患者)，通常就会开始进行治疗。有些药物既可以治疗 HSV 感染也可以治疗 VZV 感染，而且作用靶基因是相似的(例如，TK 和 DNA 聚合酶基因)(表 115-3)。与 HSV 相比，对 VZV 的抗病毒药物研究要少一些。不过近期一个表型研究[74]提供了基因型分析的支持数据，该研究分析了与 TK 和 DNA 聚合酶基因突变相关的交叉反应模式。对 TK 和 DNA 聚合酶两个基因上的耐药相关突变位点进行了定位，在基因分析时，可作为分析突变的参考依据。然而，表型分析法多数由商业化的参比实验室提供，不过截止撰写本文时，美国目前尚无临床实验室提供 VZV 药敏试验检测。

2. 人类免疫缺陷病毒(HIV) HIV 耐药性突变的基因型筛查是监测治疗无应答患者的方法[11,75-76]，也用于新诊断患者的基线筛查(http://www.aidsinfo.nih.gov/Guidelines)。利用专家小组定期更新的耐药突变的算法来解释基因型实验中检测到的突变。目前有 1 种经 FDA 核准的 HIV 基因分型试剂盒，即 ViroSeq HIV-1 基因分型系统试剂盒(Abbott Diagnostics)[21,77-81]。这种试验采用非巢式逆转录 PCR，扩增出 HIV-1 蛋白酶基因(1-99 位密码子)和 RT 基因(1-335 位密码子)，随后进行 Sanger 法测序。此实验方法是经过 HIV-1 B 亚型验证的，不过在一些非 B 亚型的毒株上也得到了成功的应用，包括重组的 HIV-1 毒株[78,80,82-84]，这些重组毒株与 HIV-1 B 亚型有着相似的突变[85]。第二种 FDA 批准的试剂，TrueGene HIV-1 基因分型测定法(Siemens Healthcare Diagnostics，Deerfield，IL)于 2014 年停产。近年来，越来越多的临床实验室，包括学术的、商业化的和政府支持的实验室，也研发了 LDT 分型方法，其中的数种利用了 NGS 方法[86]。

目前可用于 HIV-1 感染治疗的药物靶向的是蛋白酶、逆转录酶、整合酶、病毒的膜融合和进入(http://aidsinfo.nih.gov/drugs；https://www.fda.gov/forpatients/illness/hivaids/treatment/ucm118915.htm)。在过去的十年或更长时间里，新的不以蛋白酶和逆转录酶(non-Pro-RT)为靶点的 HIV-1 药物得到了 FDA 的批准。例如，恩夫韦肽(enfuvirtide)作用于包膜基因中 gp41 编码的融合肽，它是久治不愈者的选择之一。恩夫韦肽的耐药性突变被定位在位于 gp41 包膜蛋白的重复序列(35～43 位)[87]。Elvitegravir 和 dolutegravir 是针对 pol 基因编码的整合酶

的整合酶链转移抑制剂[88]。马拉维若(maraviroc)是基于CCR5嗜性毒株入侵抑制剂,与包膜基因的V3环有关[39]。

目前,通过基因分型技术识别这些药物的已知抗病毒耐药突变已作为LDT在研发过程中。有一种商业化的RUO(仅用于研究的)基因分型试剂盒已有供应,用于检测整合酶耐药性突变,也就是ViroSeq HIV-1整合酶基因分型系统试剂盒。目前还没有RUO或者FDA批准的商品化试剂盒可用于马拉维若或其他CCR5抑制剂的耐药性筛查。马拉维若作为扩大使用的一线药物用于治疗携带有CCR5嗜性毒株、未接受过药物治疗的HIV感染者,这就需要确定病毒的共同受体的本底。目前,Trofile(Monogram Biosciences/LabCorp,South San Francisco,CA)作为一种商品化试剂盒,能够确定病毒是利用CCR5还是CXCR4共受体。由于这种表型测试需要克隆患者来源的HIV-1包膜蛋白基因以生成重组假病毒进行评估,因此必须有1000拷贝/ml血浆的病毒载量才能确保可靠的靶标扩增。在检测不到血浆病毒载量的患者中考虑更换CCR5抑制剂时,可以使用全血确定HIV-1储库的嗜向性(Trofile DNA)。

分子表型实验花费很高,用时很长。一个替代方案就是使用Sanger法或焦磷酸法对V3环区进行测序。马拉维若耐药毒株的基因分型涉及V3环区的共受体分子从CCR5转变为CCR5和CXCR4混合,或者转变为单一CXCR4。产生的一致性序列信息随后被提交到交互网站,网站数据库将表型和基因型对应起来。分析涉及使用不同的算法确定V3环区或仅仅11位和25位的氨基酸和净电荷,这些区域能够预测是使用CCR5还是CXCR4共受体[89-91]。最常使用的两种预测共受体嗜性的算法是位置特异性分值矩阵(position-specific scoring matrin,PSSM)[92]和Geno2Pheno共受体算法[93]。多个研究小组评估和报道了这些策略作为临床工具的应用[90,94-95]。尽管V3环区的测序方案已经应用多年,不过开发出各种分析算法(有的是免费的网络服务器)对大多数的LDT用户而言灵活而且有吸引力。

临床上可以使用基于NGS的基因型测定法来确定HIV的共受体嗜性,包括不列颠哥伦比亚HIV/AIDS优秀研究中心(加拿大温哥华)提供的HIV-1CCR5趋向性测试(V3)[95]。由美国主要参考实验室提供的HIV-1 Coreceptor Tropism、Ultradeep Sequencing[96]和DEEPGEN HIV[由俄亥俄州克利夫兰大学医院凯斯医学中心(Case Medical Center)开发],它们还评估了蛋白酶、逆转录酶和整合酶基因的耐药性突变[86]。

3. 肝炎病毒

(1)HBV:一些5′核苷酸/核苷类似物已经获批用来治疗慢性乙型肝炎病毒感染,这些药物的靶点是HBV DNA聚合酶和逆转录酶编码区,见表115-3[97-98]。α2b-干扰素(IFN-α2b)和peg-IFN也已被推荐使用。但是治疗效果取决于HBV的基因型[99-100],并且干扰素并非直接作用于HBV。因为HBV很难培养,所以只能选择用基因分型的方法检测毒株耐药性。基因型检测法可检测聚合酶/RT基因上已知的耐药突变(表115-3)。最常见的HBV病毒基因型检测方法是对血浆中HBV病毒的聚合酶/RT区直接测序,从而确定与药物耐药性有关的突变位点。或者也可以用特异性探针对来自于样本的PCR产物进行反向杂交技术来验证[98]。

目前,没有FDA核准/批准的测序试验系统用来做HBV抗病毒敏感性检测。至少有1种RUO试剂盒可用作HBV基因分型(Abbott Diagnostics),其对HBV聚合酶/RT区进行部分区段的测序(130～1161),已知的耐药位点在这一区域。没有与该测定法相关的软件可以从色谱图中生成共有序列,但建议使用SeqScape v2.5或更高版本进行分析。试剂盒操作方法提供了用于分析SeqScape中HBV序列的参数。TrueGeneHBV基因分型测定法(Siemens Healthcare Diagnostics,Deerfield,IL)于2014年停产。

也有LDT测序方法来检测HBV基因型和(或)检测抗病毒药物耐药性[101]。只有某些少数的HBV亚群的毒株数量占到整个群体数量的25%以上,才能通过Sanger测序检测到这些变异株[97,101]。不过这个方法可以检测到所有已知的或补偿性的突变,包括最新的可能与耐药相关的基因突变[98]。对于相关突变的解释需要结合实际表型,得到的一致性数据还要经过SeqHepB(Evivar)等其他的相关数据库的进一步分析[102-103]。NGS方法已开始应用于HBV[104],尽管临床上尚未广泛进行测试。

Innogenetics INNO-LiPA HBV DR version

2(Innogenetics N. V., Ghent, Belgium)是一种商品化的反向杂交法试剂盒(欧洲CE认证),在美国之外也有售卖,能够检测已知的HBV聚合酶/逆转录酶基因的突变。这些突变与拉米夫定(lamivudine)、阿德福韦酯(adefovir)、恩曲他滨(emtricitabine)、替比夫定(telbivudine)等的耐药性有关[48,105](表115-3)。与Sanger测序法比较,这种方法可以更为敏感地检测到少量的HBV,比种群测序的方法更加节省人力[97]。但是该方法的敏感性也受到序列邻近区域的多态性影响[105-106]。RUO INNO-LiPA HBV分型试剂盒(Innogenetics)是基于HBV的表面抗原Sag的序列,也可用于HBV基因分型[107]。

(2)HCV:历史上慢性HCV感染的治疗局限于干扰素/利巴韦林,这种治疗的成功率不同,取决于病毒基因型。基因1型对干扰素的治疗最不敏感,最可能发展为慢性感染[108]。在过去的几年中,HCV抗病毒疗法发生了革命性的进展。这些直接作用的抗病毒制剂包括靶向非结构蛋白3/4A(NS3/4A)丝氨酸蛋白酶、NS5A复制复合物和NS5B聚合酶的药物(表115-3)。当前的建议包括针对这些蛋白质中至少2种的联合疗法,并且所有一线治疗方案现在都不含IFN(www.hcvguidelines.org)。这些方案非常有效,即使在已经发展为肝硬化的患者中,也有超过90%的病例获得了持续的病毒学应答。尽管现在有数种药物组合提供了泛基因型覆盖(索非布韦-韦帕他韦;索非布韦-韦帕他韦-伏昔拉韦),基因分型仍然是方案选择的重要组成部分。

根据美国肝病研究协会(American Association for the Study of Liver Disease, AASLD)和美国传染病学会(Infectious Disease Society of America, IDSA)的指南,目前HCV基因型药敏试验的临床应用仅限于2个特定条件:①HCV1a基因型感染,开始用elbasvir-grazoprevir治疗时(不论有无肝硬化);②当开始使用西米普韦-索非布韦(simemeprevir-sofosbuvir)时,感染HCV1a基因型并伴有肝硬化(表115-3)[109]。尽管不是IDSA指南的一部分,但在启动达卡他韦-索非布韦(daclatasvir-sofosbuvir)治疗感染HCV1a基因型并患有肝硬化的患者时,达卡他韦说明书中也建议进行基因型药敏试验。这些NS5A和NS3/4a耐药相关氨基酸替代(RASs)的鉴定也可用于基因1型感染中,NS5A或赛美普韦-索非布韦治疗失败的患者。

当前没有可用于鉴定NS3/4A或NS5A RAS的FDA批准/审批的测定法。许多实验室开发的用于HCV测序的RAS检测已被评估[110-111],基于NGS的联合基因分型和NS3/4a/NS5A RAS检测在2016年获得了CE认证(圣淘沙SQ HCV基因分型检测;新加坡Vela Diagnostics)。在美国,可在多个参考实验室购买基于序列的HCV RAS检测。预计将在近期内批准更多的HCV疗法[112],因此有必要密切监视HCV耐药性研究和专业协会指南,以确保检测方法是最新的。

4. 流感病毒　甲型流感病毒抗金刚烷胺和金刚乙胺的耐药性突变位点在M2蛋白上[6](表115-3)。不过,因为目前流行的甲型流感病毒对它们有很高比例的耐药性,已经不再推荐使用这些药物。当前推荐的流感治疗方案是使用神经氨酸酶抑制剂,例如,奥司他韦(oseltamivir)、扎那米韦(zanamivir)和帕拉米韦(peramivir)[113-115]作为治疗甲型流感的药物[116]。针对神经氨酸酶抑制剂的突变位点位于神经氨酸酶(NA)基因上,包括2009年甲型H1N1流感病毒上最常见的神经氨酸酶抑制剂耐药突变NA H275Y。已经开发了多种LTD用于检测耐药相关基因型。其中包括实时检测[49,117]、高分辨率溶解RT-PCR[118]、通过毛细管电泳进行的SNP分析方法[50]和实时等位基因鉴别测定[41],WHO已将其用于筛选H1N1流感病毒。这些检测主要针对季节性流感病毒(H1N1)和2009年H1N1病毒的H275Y突变[119]。不过,测序也用于检测NA基因中的其他耐药性突变,文献中已报道了Sanger和焦磷酸测序方案[120-123]。应注意的是,在表115-3中的突变其确切的编号可能取决于病毒的亚型。用于流感病毒分型、分亚型和基因型耐药性检测的NGS方法也正在开发中[124-127]。突变检测更可能用于免疫功能低下的高危个体及出于监测的目的[127]。

五、抗病毒敏感性测试的说明

FDA核准的用于HIV敏感性测试的试验系统有2002年批准的ViroSeq(Abbott),包含与试剂盒相关的软件,用于分析从每一份标本中得到

的原始序列数据并生成一致性序列。反过来，该测定法可对一致性序列中发现的突变提供基于指南的解释，并生成正式报告。这些报告有助于内科医生根据抗逆转录病毒效果的最大可能性来为患者制定相应的治疗方案。FDA 还核准了软件的验证及定期更新的用于使用和解释的指南。该系统被认为是用于耐药性检测的基因分型的标准操作系统。ViroSeq HIV-1 整合酶基因分型试剂盒具有相关的软件，该软件可以分析生成的序列以形成一致性序列，也可以为样品创建耐药性报告。

(一)生物信息学:虚拟表型

由 RUO 或者 LDT 的实验得到的结果需要依靠生物信息学来解释。实验室可以选择在操作规程中不同的步骤分析 Sanger 测序后的结果(图 115-2)。临床医生的责任是根据实验室提供的突变情况解释来判定突变的临床意义。这些实验最具代表性的就是 HBV、HCV 和 HIV-1 感染的抗病毒耐药性检测。

那些希望应用 RUO 或 LDT 自己来做基于序列数据的抗病毒敏感性试验的临床实验室，为了测试得到的原始序列数据，需要有相关的分析软件。能够进行普通序列分析以及能形成一致性序列的软件可以买到。想要完成分析，Schafer[11] 建议访问专业的“专家系统”。这些系统是相互作用的、相关联的数据库，依据规则算法计算出单个药物和耐药相关突变，并推断数据的意义(表 115-5)。这些算法是以“知识”为基础的系统作为指导，与初级突变和二级突变、表型数据和临床转归有关。

另一个需要考虑的问题是获得足够安全的计算机空间或者原始数据、软件和分析结果的存储服务器。对于 Sanger 测序尤其是 NGS，对样本数据累积文件的分析会是非常深入的。如果实验室或者它所在的机构要分配计算机存储空间，这种存储空间对于监测患者随着时间的变化是很有用的。还有一些商业机构可以提供这种服务，不过需要收费。

表 115-5 对已完成基因分型的样本进行耐药分析的相关生物信息学网站

网点位置	使用费	病毒	基因分型区域	交互式	提交的样本	提供的信息	其他建议/特点
斯坦福大学 HIV-1 药物耐药数据库(Stanford University, Palo Alto)	免费	HIV	蛋白酶-逆转录酶 整合酶	是	多序列的 FASTA 文件；单个序列的测试文件确定	耐药突变 多态性 临床解释 亚型	新的网络链接允许单位和个人使用网站数据库工具 流行病学和治疗观察的交互工具
Geno2Pheno (Max Planck Institute, part of GENAFOR, Bonn, Germany)	免费	HIV	蛋白酶-逆转录酶 整合酶 GAG 共受体	是	一致性序列的 FASTA 文件 患者临床数据	耐药突变 多态性 临床解释 亚型 基因型/表型的相关性	建立的模块最多
		HCV	NS3-蛋白酶	是	普通或一致性序列的 FASTA 文件	耐药突变 临床表型解释	数据包括基因型数据对表型的解释 不能将其作为临床决策的唯一判定依据
			NS5B NS5A		一致性序列的 FASTA 文件	基因型，基因亚型	
		HBV	聚合酶基因/表面基因	是	一致性序列的 FASTA 文件	聚合酶基因突变 SHB 基因突变 预测对 5 种抗逆转录病毒药物的耐药表型	需要提交大量逆转录酶序列才能对其进行解释，不能将其作为临床决策的唯一判定依据

(续 表)

网点位置	使用费	病毒	基因分型区域	交互式	提交的样本	提供的信息	其他建议/特点
PSSM(位置特异性打分矩阵)(University of Washington, Seattle, WA)	免费	HIV	共受体	否	V3 氨基酸的 FASTA 文件	基于带电荷 V3 环氨基酸预测共受体的使用	针对 B 和 C 亚型 不能预测亚型
SmartGene 集成数据库网络系统(IDNS)	是	HIV	蛋白酶-逆转录酶 整合酶 GAP Gp41-gp120(V3)	是	序列图谱文件 FASTA 文件 FASTA Q 文件 Sff files	耐药突变 多态性 临床解释 亚型 少数变种的定量	用户可在模块中编辑图谱 通过网站链接,对不同数据库及算法进行对比,解释临床数据 网站作为一个安全运行和数据管理中心,可以存储累积数据,能够调出数据进行分析
	是	HCV	NS3 HCV 5'UTR NS5B NS5A	是	序列图谱文件 FASTA 文件 FASTA Q 文件 Sff files	耐药突变 亚型 少数变种的定量	同上
	是	流感病毒	HA NA		序列图谱文件 FASTA 文件	耐药突变 亚型	同上
	是	HSV,TK Pol			序列色谱图文件 FASTA 文件	耐药突变 亚型	同上
SeqHepB (ABL SA, Luxembourg)	是	HBV	聚合酶基因(逆转录酶)	是	序列色谱图文件 FASTA 文件 FASTA Q 文件 BAM/SAM 患者血样	耐药突变 多态性 临床解释 基因型 血清型	链接到体外表型数据库

基于知识的专家系统(knowledge-based expert)模式起源于商业机构。在高效抗逆转录病毒疗法时代早期开发的系统是基于 Antivirogram (Virco;Jannsen Diagnostics 收购)的虚拟表型系统。从临床样本获得的基因型序列数据送到该公司,该公司通过一种与自有的数据库比对的算法进行分析和解释,以推断相应的表型[11,128]。他们的大型数据库包含已知基因型,这些基因型与表型和(或)临床结果相关。虚拟表型系统自 2013 年 12 月 31 日起已不可用。Monogram Biosciences 公司的 GeneSure MG 和 GenoSurePRIme 试验将来自提交样本的 HIV 基因型与本公司自身关联的基因型和表型的大型数据库进行比较。较新的产品 GenoSure Archive 使用 NGS 来检测 HIV 病毒载量受到抑制的患者细胞中的 DNA。目的是识别耐药突变,同时用特定的算法预测表型耐药情况。

还可以通过非商业化互动网站来提交一致性序列,网站可以提供对虚拟表型的数据解释,并反馈给数据提交的实验室(表 115-5)。这些网站有用,但是目前尚不规范、不标准。对不同的病毒/药物组合,它们使用不同的算法,不同水平的操作人员均可使用[91-93,102-103,129-132]。将基因型、表型与计算方法关联起来的数据库也是公开的。一些研究者对比了这些网站的可靠性与一致性[90-91,94]。这些网站中,大多数可以通过比对一致性序列检测与耐药相关的突变,一些网站可以对所观察到的与药物疗效相关的突变的含义进行解释。一些网站可以提供更多的工具,以供进一步分析使用。所有这些网站使用的序列数据全部是由 Sanger

测序法得到的序列或者 NGS 法获得的一致性序列。尽管 Geno2pheno 提供了直接从超深焦磷酸测序[95,133-137]接收数据的模块，但截至 2016 年中期，制造商不再支持此方法(454 Genome Sequencer; Roche Molecular Diagnostics)。

(二)实验解释

从技术水平上说，各种抗病毒药物试验方法之间很少或几乎没有标准化，不过必需的能力测试将可以确保一定的实验质量。测序检测可以受多种因素影响。假设实验室遵循良好的实验室规范(good laboratory practice，GLP)，遵循严格的使用限制和空间分区来控制患者样本污染是非常关键的。当患者样本中病毒含量(VL)低时，这一规范尤为重要。商品化 HIV-1 检测试剂盒在患者样本中的最佳检测下限是病毒量为 1000～2000 拷贝/ml，为减少污染可能，作为进一步的安全措施，把使用非巢式 PCR 法生成测序模板加入了实验操作规程中。提取的初始容量要求为 200～500 μl，通常是血浆标本。在某些情况下，初始样本体积非常少，例如做血斑样本的基因型或者患者体内的 VL 接近于检测不到时，许多 LDT 试验使用巢式 PCR，这种扩增很容易产生污染。如果在严格按照操作要求的条件下，仍然可以生成高质量的数据。

FDA 核准的诊断性测序检测分析软件整合了一些算法，来对实验数据进行准确的解释。在更新的算法投入使用之前也需要 FDA 的核准。或者，以非 FDA 核准的 Sanger 测序法作为 LTD，这需要每个实验室建立性能测试并且提供有用的解释。解释的依据可以来自文献、实验室真实的实验数据、在线数据库(如 http://hivdb.stanford.edu)。尽管无论使用哪种算法，所推算的数据的临床意义可能是非常相似的，但是使用的这些算法还没有标准或者监督机制。最后，在患者治疗过程中，使用实验室提供的这些结果和解释是实验室医学主任和初级卫生保健提供者的职责。

对于基于 NGS 的 LDT，应在仪器上进行实际测序之前，先优化测试性能。鉴于该测定法能够识别低至 1%含量水平的突变，因此，一些人工参数可能会影响低水平检测的准确性，因为很少有机会评估和编辑原始序列数据。这包括在逆转录或 PCR 生成单分子测序模板过程中可能产生的错误[138]。在已建立的生物信息学流水线程序(pipeline program)中，进一步分析序列数据对于准确解读已鉴定的突变也至关重要[47]。开发的各个阶段均有流水线程序，有些更人性化，很多不收费。Noguera-Julian 等对流水线程序进行了很好的描述[47]。

六、未来的方向和正在出现的新技术

近年来，抗病毒检测方法随着新出现的分子生物学技术而得到显著发展。这些基因分析技术为病毒的耐药性分析提供了宝贵的工具，尤其是对难以组织培养或完全不能培养增殖的病毒(例如 HBV 和 HCV)，现在已常规用于病毒感染的临床治疗。因为已经识别出了很多导致对多种抗病毒疗法产生耐药性突变的基因和核苷酸位置，基因型耐药性检测是可行的。由于基于病毒培养的方法已在临床病毒学实验室中逐步淘汰，因此，临床表型耐药性分析主要限于快速复制的病毒(如 HSV)和怀疑耐药性但基因型检测尚无定论的病毒(如 HIV-1)。从研究的角度来看，表型测定对于检测新出现的耐药性和确认新发现的耐药相关突变仍然至关重要。

表型和基因型分析需要持续改进的方面是努力提高分析的一致性和标准化。例如，用于 HSV 噬斑试验的 CLSI 方法[139]和使用*UL97* 基因靶标进行 CMV 基因型检测的方法[67,140]。此外，可以从多家供应商处获得用于 HIV-1 基因型抗病毒药敏试验的能力验证材料。

制药业不断积极研发新的抗病毒药物，尤其是针对慢性病毒病病原体(如 HCV、HBV 和 HIV-1)。同时，必须开发抗病毒耐药性检测方法以检测和监测对这些新型疗法的耐药性。因为新的抗病毒药物十分昂贵，可能由于疗程比较长而导致产生耐药性，因此这些检测非常重要。最终的目标之一就是发展能够预测可能出现的耐药性的方法。使用 NGS 技术可以进行此类检测，其能够检测到低于 5%的序列变异；不过，如此少量变种存在的临床意义还需要明确。同时，就像前文提到的那样，数据的管理和储存及操作者的熟练程度和稳定性也都应被重视，而这些都应与试剂

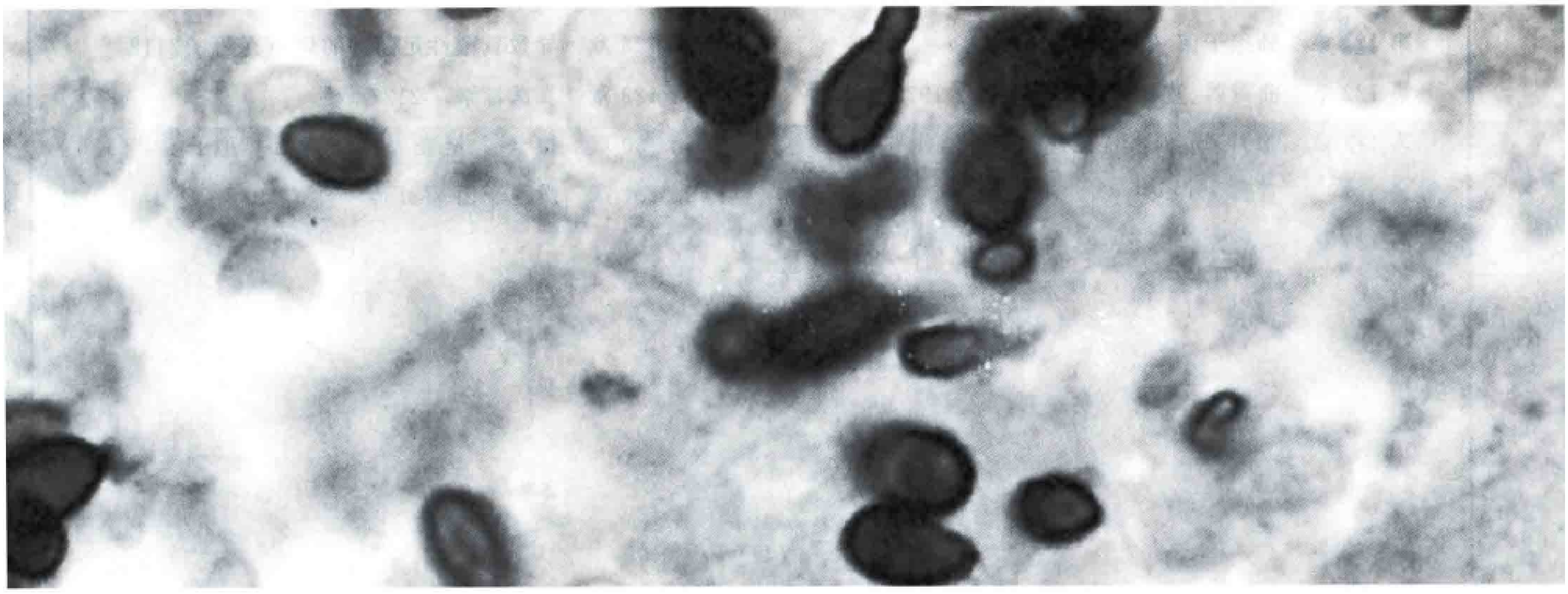
的研发同步进行。

此外，人们对替代标本的使用越来越感兴趣，例如，干血斑，易于收集和运输，可以促进病毒基因分型的可及性，特别是对于感染 HIV-1、偏远、接受服务不足的人群[141]。尽管许多基因型分析利用测序技术来广泛覆盖耐药性突变，但在无法进行测序以及使用的治疗方案仅会导致少量的突变时，也可以使用更简单、成本更低的筛选试验来对有限数量的已知突变进行检测，以指导治疗。例如，最近评估 HIV-1 抗病毒耐药性的工作表明，仅 6 种突变检测就能覆盖低等和中等收入国家中近 99%的在一线治疗方案中核苷逆转录酶抑制剂和(或)非核苷逆转录酶抑制剂治疗失败的患者[142]。这样的靶向等位基因特异性点突变测定法可以在临床实验室中使用，或适合于在从样本到结果的系统中进行近距离检测或即时检测。

随着新技术的引入及病毒感染和治疗方案的改变，抗病毒药敏试验的应用很可能会迅速发展。对这些新技术所获取数据的临床意义的评估需要与时俱进。

参考文献请扫二维码查阅

第六部分　真 菌 学



第六部分　真菌学

第15篇

总　　论

第116章　真菌的分类学、分类和命名

MARY E. BRANDT，DAVID W. WARNOCK

（杜艳　译；付英梅、李若瑜　审校）

目前已经命名的真菌至少有13.5万种。但尚未发现的真菌估计有100万～1000万种之多，据统计，每年发现的新种类有1000～1500种[1]。在已经命名的真菌中，与人类或动物疾病相关的不足500种，而能够感染正常个体的不足50种[2]。然而，越来越多环境中的霉菌成为了条件致病菌，能够导致免疫功能不全或低下的宿主发生严重或致命性的疾病。这些霉菌是一类自然栖息在土壤或植物、木材、堆肥或腐败食物中的生物，其中许多被真菌学家、植物病理学家和食品微生物学家所熟知，但对大多缺乏真菌鉴定正规培训的临床微生物学家存在问题。真菌鉴定具有挑战性，而且有时会令人灰心，因为其关键在于认识真菌形态学特征及熟悉各种不同的结构和术语。晦涩的真菌学术语是妨碍许多微生物学家掌握真菌鉴定的一个主要因素。然而，快速DNA测序技术的出现改变了这一过程，促进了临床分离株的准确鉴定。分子水平的分析已经对真菌的分类学（taxonomy）、分类（classification）和命名（nomenclature）产生了重大影响，包括许多具有重要医学意义的物种。

一、真菌的形态特征

真菌是一类独立的真核生物群，在某些方面不同于植物和动物等生物群体。真菌有坚硬的细胞壁包裹，细胞壁主要由几丁质、葡聚糖、壳聚糖、甘露聚糖和糖蛋白以不同的组合形式构成。真菌细胞壁的这些特征与动物和植物形成鲜明对比，动物没有细胞壁，而植物细胞壁的主要成分是纤维素。和其他真核生物一样，真菌细胞有真正的细胞核且有核膜包被，细胞分裂形式是减数分裂或有丝分裂。

真菌是异养型生物（缺乏叶绿素），因此需要现成的有机物作为自己的营养。真菌生活在食物或培养基中，通过分泌胞外酶降解外源底物获取营养，还可以通过细胞壁吸收释放的营养物质。真菌存在于整个自然界中，它们在将植物吸收的养分返还至土壤的过程中也发挥着重要作用。

真菌可以是多细胞或单细胞。多细胞真菌的基本结构单元为一连串的多核的、管状、丝状细胞［称为菌丝（hypha）］。大部分多细胞真菌营养生长阶段是由大量分支菌丝组成，称为菌丝体（mycelium）或叶状体（thallus）。每个菌丝有坚固的细胞壁，菌丝长度也会随顶端生长和细胞有丝分裂而增加。低等的真菌菌丝无隔膜（无隔菌丝）。而高等真菌的菌丝被横隔壁（称为隔膜）分成隔间或小室，这种菌丝被称为有隔菌丝。霉菌（mold）通常指的是在显微镜下观察以多细胞菌丝体形式存在的真菌。

许多真菌以独立的单细胞的形式存在，通过从母体表面芽生的方式产生相似的细胞进行繁殖。芽生的细胞可以与母细胞分离，或者继续附着在母细胞上再出芽产生另一个细胞。以这样的方式，一个母细胞可以产生一连串的细胞。酵母是指无菌丝、仅有松散排列的出芽（buding）细胞构成的真菌。在某些情况下，母细胞在出芽前不断伸长产生一串细长的细胞，称为假菌丝（pseudohyphae）。与真菌丝不同的是，相邻的假菌丝细胞间的连接处有明显的收缩。酵母菌是一个既非天然也非正规的分类群，而是在许多真菌中都会出现的一种生长形式。

许多重要的医学真菌生长形态的改变是其组织侵袭过程的一部分。这些所谓的双相型病原体（dimorphic pathogens）通常由在自然环境中形成

的多细胞霉菌转变为组织中芽生的单细胞酵母，这种形态的转换受温度的影响，显示出温度相关的双相性。荚膜组织胞浆菌（*Histoplasma capsulatum*）、皮炎芽生菌（*Blastomyces dermatitidis*）、巴西副球孢子菌（*Paracoccidioides brasiliensis*）和申克孢子丝菌（*Sporothrixschenckii*）就是这种双相型形态改变的最典型的例子，但许多其他的真菌病原体在组织和培养中表现出的差异则比较细微。

真菌是通过孢子(spores)或分生孢子(conidia，是conidium的复数形式)形成镜下可见的繁殖体进行繁殖的。分生孢子是指来自于无性繁殖过程经有丝分裂形成的繁殖体。除了偶然性的突变，无性孢子与母体完全相同。无性孢子生命周期较短，其大量繁殖以确保能够分散到新的栖息地。许多真菌也能够进行有性繁殖，通过减数分裂将2个细胞核融合。有些真菌是自体受精的(同宗配合 homothallic)，它们能够在同一菌体的不同细胞间形成有性结构。然而，大部分真菌都是异宗配合(heterothallic)的，只有在2个相配的菌株接触时才能形成有性结构。一旦2个相配的单倍体核融合，即发生减数分裂，继而产生有性孢子。在某些真菌中，单倍体有性孢子就是独立的生殖细胞，整个结构大小是显微镜下可见的。然而，有些情况下，数以百万计的孢子组成肉眼可见的"子实体"(fruiting bodies)，如蘑菇。真菌的有性生殖及其产生的结构形式可以为其分类提供参考。

二、真菌的命名

真菌的科学命名遵循国际命名法规（International Code of Nomenclature，ICN）（http://www.iapt-taxon.org/nomen/main.php），专门为藻类、真菌和植物命名，于2011年被采纳。给新的真菌命名必须遵循ICN的命名规则；否则，这个名字将被视为无效[3]。有效的真菌名称应以拉丁语双名制的形式命名，应附有英文或拉丁文的描述，命名者所描述的真菌，其活的培养物应储存在公认的菌种库中。该名称应在MycoBank在线分类数据库(http://www.mycobank.org/)中注册，并获得一个注册编号。

真菌的名称可能会因一些原因而改变。许多常见的和广泛分布的真菌已经被多次描述为新种，因而有不止一个名字。一般情况下，任何物种的正确名称都应是最早发表的符合命名法规范的那个名称。后来的名字被称为异名。为了避免出现困惑，ICN也允许一些例外，这是因为如果某个菌株早期的名称被忽视后，新的名称已经普遍使用，如果再改用早期的名字就会出现问题[3]。

真菌名称改变的另一个原因，是根据新的研究发现需要将一个物种从一个属转移到另一个属或将其作为一个新属的模式种。这样的变化是很正常的，但同时规定，除了依据拉丁语语法规则而进行的词形变化之外，种名应保持不变。一个物种转移到一个新属后，往往会保留该生物最初应用的种名。例如，当寄生瓶霉（*Phialophora parasitica*）被移动到一个新的属，它的名字就变成了寄生暗色枝顶孢霉（*Phaeoacremonium parasiticum*）。

真菌命名的复杂性令许多微生物学家困惑，其原因在于很多真菌都不只有一个名称，这显然违背了生物分类的基本原则，即一个生物体只能有一个正确的名称。如本章前一节所述，许多真菌具有无性生殖阶段[或无性型(anamorph)]，其特点是产生无性分生孢子，有性阶段[或有性型(teleomorph)]的特点是产生有性孢子[如子囊孢子(ascospores)、担孢子(basidiospores)]。许多真菌产生无性型和有性型的情况并不清楚或者很少被观察到。正因为如此，真菌学家经常给无性阶段和有性阶段分别取名。这是因为无性型和有性型是在不同时间分别被描述和命名的，两者没有被相互联系起来。随着分子检测的广泛应用，现在有可能确认这些不同形式为同一物种。由此带来的结果是，去除了很多用于同一物种的有性型和无性型的多余名称[4]。

这些发展反映在最新的命名法中，截至2013年1月1日，该系统中停止分别使用无性型和有性型的名称，不再允许双重命名系统，真菌学家开始为许多真菌物种从现有的几个名字中选择一个名字。同一种真菌的所有合法名称，不管是有性的还是无性的，均可以作为该菌的正确名称。在国际真菌分类委员会（International Commission on the Taxonomy of Fungi，ICTF）（http://www.fungaltaxonomy.org/subcommissions）的主持下，已经成立了工作组和委员会，将提出拟接受或拒绝的名称名单供批准。

三、真菌的分类学和分类

分子系统发育学(molecular phylogenetics)的出现引发了真菌分类的一场革命。在过去，真菌的分类主要是基于它们的形态特征，而不是基于生理和生化上的差异，而这些差异在分类中是很重要的。然而，近年来，比较DNA序列分析(comparative DNA sequence analysis)的应用，使真菌生命树(the fungal tree of life)向基于系统发育识别物种的方向发生了深刻而持久的改变[5-6]。一个物种是指在多个基因谱系(gene genealogies)(指不同遗传位点的DNA序列)中具有一致性的一群微生物，而不仅是拥有共同的形态或者能够互相交配的生物。部分基因通常用于构建谱系。基因树内较一致的分支被用来连接物种。真菌中许多不同的基因和基因片段在分类中的作用已经得到研究，但最广泛使用的仍然是核糖体RNA编码基因(ribosomal RNA gene)的保守区域，特别是核糖体DNA的2个内部转录间隔区域。

分子系统发育分析(molecular phylogenetic analysis)的进展也极大程度地修正了包括真菌在内的真核生物的分类。Adl等[7]提出将真核生物分为5个单系(monophyletic lineages)或超群(supergroups):SAR超群[是由这个分支中3个组合Stramenopiles(译者注:建议翻译为"不等鞭毛类"),Alveolata(译者注:建议翻译为"囊泡虫类"),和Rhizaria(译者注:建议翻译为"有孔虫界")的首字母缩写而来],Archaeplastida(译者注:建议翻译为"泛植物超群"),Excavata(译者注:建议翻译为"古虫界超群"),Amoebozoa(译者注:建议翻译为"根足门超群")和Opisthokonta(译者注:建议翻译为"后鞭毛生物超群")(第135章)。在这个系统发育分类中，这些超群取代了先前包含真核生物的界。真正的真菌(true fungi)组成了一个单系的进化枝(clade)的，并划分在Opisthokonta(译者注:建议翻译为"后鞭毛生物超群"),该超群还包括单细胞动物和一些原生生物[7]。分子分析也导致一些微生物被重新分配到真菌中，最明显的是耶氏肺孢子菌(*Pneumocystis jirovecii*),现在归入了子囊菌门(phylum Ascomycota)(第121章),微孢子虫(microsporidia)也被确定为真菌(第131章)。

除了真正的真菌以外，真菌学家们还研究许多与人类和动物相关的真菌样微生物，如诡诈腐霉菌(*Pythium insidiosum*)和西伯鼻孢子菌(*Rhinosporidiumseeberi*)(第130章)。这些微生物，不是狭义的真菌，而是"副真菌"或"假真菌",原生生物和真正的真菌都具有真菌样形态学特征。链壶菌属(*Lagenidium* spp.)和诡诈腐霉菌(*P. insidiosum*)被分在藻菌界(kingdom Straminopila),卵菌门(phylum Oomycota)。这些黏液状真菌样微生物发育成稀疏的隔膜菌丝体结构，类似于丝状真菌(filamentous fungi)。它们与某些藻类群关系密切，因此现在被归入SAR超群[7]。西伯鼻孢子菌(*R. seeberi*)是一种不可培养的生物，它能产生充满内生孢子(endospores)的球形大孢子囊。它现在被归为后鞭毛生物超群,Ichthyosporea(译者注:建议翻译为"鱼鳞孢")[中黏菌门(Mesomycetozoea)],动物支(clade Holozoa)[7]。

在真菌鉴定和分类中广泛使用分子分析的结果之一是发现一些在基因上有明显差异的种群，它们应享有物种地位。这些新发现的、只能通过DNA测序来区分的隐蔽种(cryptic species),已经在许多有医学重要意义的物种中发现。例如，波萨达斯球孢子菌(*Coccidioides posadasii*)已经从粗球孢子菌(*C. immitis*)种中分出[8],然而*Blastomyces gilchristii*和卢茨副球孢子菌(*Paracoccidioides lutzii*)在基因上不同于皮炎芽生菌(*B. dermatitidis*)和巴西副球孢子菌(*P. brasiliensis*)[9-10]。目前还不清楚这些特殊隐蔽种的发现是否有助于对患者的处置。然而，这种情况可能会改变，在部分示例中，人们发现隐蔽种具有明显的表型特征(phenotypic characteristics),具有潜在的临床意义。例如，现在人们普遍认为，烟曲霉(*Aspergillus fumigatus*)是一种复杂的物种，由40多个隐蔽种组成，其中一些对唑类和棘白菌素类(echinocandin)抗真菌药物的敏感性低[11]。

有性孢子及其产孢方式曾经是接合菌门(Zygomycota)、子囊菌门(Ascomycota)和担子菌门(Basidiomycota)的主要分类依据。然而，最近证明某些真菌无性阶段或无性型(anamorph)可以成功地快速传播到新的栖息地，而其有性阶段或有性型(teleomorph)却已经消失或者还没有发现。即使缺乏有性型，在无性型DNA序列分析的基础上仍然可以将这些真菌划分到子囊菌门和担子菌门[12]。过去将这些无性繁殖的真菌划分在一个人

为创建的群内，称为"不全菌纲"（也称为以形式区分的"半知菌"），根据无性繁殖结构的形态特征将其人为划分为不同的纲。但现在对这些严格无性型和未发现有性型的真菌，已不再设立任何独立的正式分组。尽管如此，真菌学家仍然根据霉菌的无性生殖特征用于常规的鉴定（见下文）。

真菌界

传统上，真菌是以分级的方式排列，每级用一个特定的词尾结束：门，-mycota；亚门，-mycotina；纲，-mycetes；目，-ales；科，-aceae[13]。每个科由若干属组成，这些属又被分为不同的种。随着分子系统发育学的出现，在较高级别的分类时是不稳定的，因为分子分类数据具有相对性，并且在任何一个分类层级上都不存在划分界限的"金标准"[4]。Hibbett 等在对真菌界进行了全面的系统发育分类时，认可了 7 个门、10 个亚门、35 个纲、12 个亚纲和 129 个目[14]。虽然在真核生物分类的最新修订版中不再使用这些熟悉的分组名称[7]，但本文保留了这种基于等级的分类方法。

构成真正真菌的七个门是子囊菌门（Ascomycota）、担子菌门（Basidiomycota）、芽枝霉门（Blastocladiomycota）、壶菌门（Chytridiomycota）、球囊菌门（Glomeromycota）、微孢子菌门（Microsporidia）和新丽鞭毛菌门（Neocallimastigomycota）。包含子囊菌门和担子菌门的分支被划分为双核亚界（Dikarya）[14]。接合菌门由于其多源性而不再被接纳[14]。由于对以前属于这个门的群之间的关系仍存疑问，这些生物被分为球囊球门和四个分类位置未定的亚门（拉丁语，意为"位置不确定的"，不属于任何一门的）。有人提出毛霉亚门（Mucoromycotina）是为毛霉目（Mucorales）而设，而虫霉亚门（Entomophthoromycotina）为虫霉目（Entomophthorales）而设[14]。

表 116-1 列出了对重要医学真菌分类分群的一个简化方案，接下来将对这些分群进行具体描述。表 116-2 提供了重要的医学真菌鉴定的简要检索表。

表 116-1 真菌界中重要医学真菌分类分群的简化方案

（根据参考文献[14]修改）

门或亚门	纲	目	具代表性的属
毛霉亚门		毛霉目	横梗霉属、根霉属
虫霉亚门		虫霉目	蛙粪霉属、耳霉属
担子菌门	银耳纲	线黑粉菌目和银耳目	隐球菌属
	伞菌纲	伞菌目	裂褶菌属
子囊菌门	肺孢子菌纲	肺孢子菌目	肺孢子菌属
	酵母菌纲	酵母菌目	伊萨酵母属；克鲁维酵母菌属（念珠菌种的有性型）；酵母属
	散囊菌纲	爪甲团囊菌目	节皮菌属（小孢子菌属和癣菌属的有性型）；阿耶罗菌属（芽生菌和组织胞浆菌的有性型）
		散囊菌目	裸胞壳菌属、散囊菌属、新萨托菌属（曲霉属的有性型）
	粪壳菌纲	肉座菌目	赤霉菌属、丛赤壳菌属（镰刀菌属的有性型）
		小囊菌目	假霉样真菌属（赛多孢属的有性型）

表 116-2 医学上重要真菌的主要群组简要检索表

1a 不能在常规培养基上生长的真菌，组织中呈囊样细胞	肺孢子菌纲
1b 可培养的真菌	2
2a 在 30℃ 菌落由芽生细胞构成	3
2b 在 30℃ 菌落由菌丝构成	5
3a 黑色菌落	黑酵母
3b 白色菌落、奶油样、粉色或红色	4
4a 尿素酶试验阳性	担子菌酵母
4b 尿素酶试验阴性	子囊菌酵母

（续 表）

5a 有分隔菌丝	6
5b 近乎无分隔菌丝(少分隔)	9
6a 有锁状联合	丝状担子菌
6b 无锁状联合	7
7a 无子实体	丝状菌类
7b 有子实体	8
8a 在子囊内含有子囊孢子的子实体	散囊菌纲
8b 含有分生孢子的子实体	腔孢菌纲
9a 产孢丰富	毛霉纲，虫霉纲
9b 无产孢;在水培养基中形成游动孢子	卵菌门

1. 毛霉亚门和虫霉亚门(原接合菌门) 传统的接合菌门已经划分为球囊菌门和4个有待进一步分类的亚门[14]。这些低等真菌的菌体寡具隔膜，由宽大的透明(无色)分枝菌丝组成。无性孢子(称为孢子囊孢子 sporangiospores)无运动性，常产生于一个封闭的囊内，称为孢子囊(sporangium)，孢子囊壁破裂释放出孢子囊孢子，有一些属的孢子围绕孢囊梗顶端的囊泡形成。有性繁殖可以产生大而厚壁的接合孢子。大部分重要的医学真菌都是异宗配合的，不产生有性结构，除非两性相对应的菌株发生接触。

毛霉亚门包含毛霉目，这是临床上最重要的一类真菌，包括横梗霉属(*Lichtheimia*)[原名犁头霉菌属(*Absidia*)]、毛霉属(*Mucor*)、根毛霉属(*Rhizomucor*)和根霉属(*Rhizopus*)。虫霉亚门包含一个医学上非常重要的目，即虫霉目，包括蛙粪霉属(*Basidiobolus*)和耳霉属(*Conidiobolus*)，是引起皮下感染的主要病原体。

2. 担子菌门 这一组高等真菌大部分成员是有分隔的丝状菌体，也有些是典型的酵母菌。有性繁殖时在称为担子的生殖细胞外形成单倍体的担孢子(Basidiospores)。这一较大的门中有3个亚门[伞菌亚门(Agaricomycotina)、柄锈菌亚门(Pucciniomycotina)和黑粉菌亚门(Ustilagomycotina)]及15个纲[14]，但仅有少数成员具有医学重要性。最主要的包括无性阶段归属于隐球菌属(*Cryptococcus*)、马拉色菌属(*Malassezia*)和毛孢子菌属(*Trichosporon*)的几种担子菌酵母(第120章)。隐球菌属属于伞菌亚门(Agaricomycotina)。在这个亚门中，分子分析表明隐球菌是多源性的，种分布于银耳纲(Tremellomycetes)内的5个主要谱系中。大多数聚集在银耳目(Tremellales)和线状黑粉菌目(Filobasidiales)[15]。

丝状担子菌在培养基中通常形成白色菌落，菌落快速生长、不产孢、形成锁状联合。后者是指在细胞分裂时，环绕隔膜形成的连接两个细胞并允许核迁移的菌丝旁路。担子的繁殖通常产生肉眼可见的结构，称为担子果(basidiomata 或 basidiocarps)，担孢子通常从子实体中强力射出。无性生殖是多变的，一些种会像子囊菌那样产孢(见下文)，但许多种却并不产孢。大多数丝状担子菌是木腐菌和专性植物病原菌。最常报道的临床重要的丝状担子菌类是普通裂褶菌(*Schizophyllum commune*)[16-17]。随着DNA测序的出现，许多不育或不可培养的真菌，如撕裂蜡孔菌(*Ceriporialacerata*)和 *Hormographiella aspergillata*[16-17]，现可以在临床实验室中鉴定。

3. 子囊菌门 子囊菌门几乎包含了50%已经命名的真菌生物，约80%是非常重要的医学真菌[2]。已知的有3个亚门：子囊菌亚门(Pezizomycotina)、酵母菌亚门(Saccharomycotina)和外囊菌亚门(Taphrinomycotina)[14]。有性生殖产生单倍体孢子，又称为子囊孢子(ascospores)，它们在称为子囊(ascus)的囊样结构中产生。子囊菌门逐步从产生单子囊的原始形式向产生含有多个子囊的子囊果(ascocarps)或子囊座(ascomata)这种大的结构转变。子囊结构上的变化是这些真菌分类的一个重要的参考依据。无性繁殖是指由生殖细胞或产孢细胞产生分生孢子(conidia，单数 conidium)的过程。在有些子囊菌中，很难将产孢细胞和菌丝体进行区分。在其他子囊菌中，可以形成承载一个或多个产孢细胞的特殊结构。子囊菌中许多遗传上不相关的物种有着非常相似的分生孢子结构，而其他遗传上相似的物种在形态特征上

可有显著差别。

外囊菌亚门(Taphrinomycotina)只有一个在医学上很重要的属，即肺孢子菌属(*Pneumocystis*)，它以前被归于原生动物界，现在经 rDNA 小亚基及其他基因序列比较后将其归为肺孢子菌纲(Pneumocystidiomycetes)[18]。酵母菌亚门包含一个医学上很重要的纲，即酵母菌纲(Saccharomycetes)，它属于最具致病性的子囊菌类酵母。子囊菌亚门包含 2 个医学上很重要的纲，散囊菌纲(Eurotiomycetes)和粪壳菌纲(Sordariomycetes)，包含了丝状的子囊菌。

酵母菌目属于酵母菌纲，其特点是酵母细胞通过出芽或裂殖的方式进行繁殖。这些真菌不产生子囊座(ascomata)，而是通过出芽细胞的直接转换、母细胞和芽细胞的结合及 2 个独立的单个细胞之间的结合来形成子囊。这一目中许多成员具有属于念珠菌属的无性阶段。该属包括大约 200 个无性的种，其有性型归于 10 个不同的属，包括棒孢酵母属(*Clavispora*)、德巴利酵母属(*Debaryomyces*)、伊萨酵母属(*Issatchenkia*)、鲁维酵母菌属(*Kluyveromyces*)、毕赤酵母属(*Pichia*)[19]。其中的许多菌将更名以确保“一个真菌一个名称”。

在散囊菌纲(*Eurotiomycetes*)，有性生殖形成子囊果，由含有子囊孢子的子囊构成。这个纲含有 7 个目，包括对人类具有致病性的种。其中最为重要的是瓜甲团囊菌目，包括皮肤癣菌和许多具有双相型系统性病原体(包括荚膜组织胞浆菌和皮炎芽生菌)的有性型。散囊菌目(Eurotiales)包括曲霉属(*Aspergillus*)的无性型及青霉属(*Penicillium*)的有性型。粪壳菌纲(Sordariomycetes)的肉座菌目(Hypocreales)包含许多无性镰刀菌属(*Fusarium*)的有性型。此外，许多具有医学意义的暗色真菌(melanized fungi)的有性型属于散囊菌纲和粪壳菌纲下的许多目，包括煤炱目(Capnodiales)、刺盾炱目(Chaetothyriales)、小囊菌目(Microascales)、格孢腔目(Pleosporales)、肉座菌目(Hypocreales)和长喙壳目(Ophiostomatales)。

尽管从临床实验室分离出的很多有隔膜的霉菌属于上述所描述的诸多纲中的一种，但是在常规的培养基上还是很难看到其有性繁殖产物的结构。产生子囊果相对丰富的几个种是波氏假阿利什菌(*Pseudallescheria boydii*)[无性型：波氏赛多孢霉(*Scedosporium boydii*)]和构巢裸孢壳菌(*Emericellanidulans*)[无性型：构巢曲霉(*Aspergillus nidulans*)]。目前大多数情况下，对这些霉菌的常规鉴定还是基于无性孢子的结构排列和产孢形式(见下文)。

4. 微孢子虫门(Phylum Microsporidia) 一些专门寄生于人类的微孢子虫长期以来被归类为原生动物。然而，系统进化分析表明这些微生物属于真菌[20]，真菌界里已为其设立微孢子虫门[14](第 131 章)。

四、酵母菌的鉴定

酵母菌既不是天然的也不是正式的分类群，而是在子囊菌类和担子菌类真菌广泛存在的一种生长形式。酵母菌的鉴定需要结合其形态学、生理学和生化特征。有用的形态学特征包括菌落的颜色、大小、细胞的形状、有无荚膜、菌丝、假菌丝(pseudohyphae)和关节孢子(arthroconidia)及厚垣孢子(chlamydospores)的产生；生化试验包括糖的同化与发酵试验和硝酸盐同化试验。具有医学意义的大部分酵母可以应用一个基于分离菌株的糖同化试验的商品化检测系统进行鉴定。此外，用显微镜检查玉米粉琼脂培养基上的形态也是必要的，这可以避免混淆具有相同生化指标的微生物(第 118 章)。在许多实验室，生化方法已被 DNA 测序或基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱法所取代(MALDI-TOF)[21]。这些方法缩短了鉴定的周转时间，免去了额外的生化验证试验。

所谓的黑酵母并不是一个正式的分类群，而是用于描述一类广泛存在并无关联的子囊菌和担子菌，这些真菌在其生活史的某个阶段能够产生黑色素的出芽细胞[22]。由于这些真菌大部分都能够产生菌丝体，所以常规的鉴定方法主要是基于无性孢子结构的形态特征和孢子发生的方式。现在采用分子方法和 MALDI-TOF 来鉴定这些微生物[23]。

五、无性霉菌的分类和鉴定

从临床实验室分离出来的大部分有分隔的霉

菌在常规培养基上并不产生有性生殖结构，过去它们的鉴定是基于无性孢子的产生方式，现在可以对这些微生物进行测序，并确定它们在真菌界中的正确位置。为此基于其分生孢子的形成，非正式地为无性或"有丝分裂"的霉菌人为设置了2个纲。丝孢纲（Hyphomycetes）直接在菌丝或特定的分生孢子梗上产生分生孢子，而腔孢纲（Coelomycetes）有更精细的被称为载孢体（conidiomata）的生殖结构。尽管这些形式不再被正式认可，但却提供了一个有用的基于形态学鉴定的准则。

（一）腔孢纲

腔孢纲中有3个人造的目，分别是球壳孢目（Sphaeropsidales）、黑盘孢目（Melanconiales）和盾座孢目（Pycnothyriales）。球壳孢目的载孢体产生分生孢子，分生孢子的特征是球形，顶端开口，产孢细胞内衬于内腔壁[称为分生孢子器（pycnidia）]；或是开放的，杯状的，在这种情况下，产孢细胞覆盖在分生孢子的表面[称为分生孢子盘（acervuli）]。这种类腔孢纲的一些菌属是人类常见病原体。其中，新双间柱顶孢菌（*Neoscytalidium dimidiatum*）是一种可能导致皮肤和指甲感染的植物病原体。直到最近才发现，该菌的无性型是双间柱顶孢菌（*Scytalidium dimidiatum*）。

（二）丝孢纲

丝孢纲包含大量的医学上非常重要的有分隔的无性状态的霉菌，包括曲霉属（*Aspergillus*）、芽生菌属（*Blastomyces*）、枝孢瓶霉属（*Cladophialophora*）、镰刀菌属（*Fusarium*）、组织胞浆菌属（*Histoplasma*）、小孢子菌属（*Microsporum*）、青霉属（*Penicillium*）、瓶霉属（*Phialophora*）、赛多孢霉属（*Scedosporium*）和毛癣菌属（*Trichophyton*）。此外，大量的丝状真菌是人类的机会性病原体。因此，对于临床微生物学家来说，能够识别和正确地鉴定这一组真菌是非常重要的。

如前所述，在鉴定这些霉菌时，分生孢子的产生过程是最主要的依据。可以划分为2种基本产孢方式：丝裂型分生孢子发生，是指现有的菌丝细胞转换成一个或更多个分生孢子；芽殖型分生孢子发生，其中分生孢子是某种出芽形式的产物（对于该主题的详细讨论，见参考文献[22]）。

1. 丝裂型分生孢子发生 丝裂型分生孢子发生时，分生孢子是从现有的菌丝细胞产生。关节孢子存在于很多真菌中，它来源于原有菌丝的断裂，代表最简单的丝裂型分生孢子产生的形式。对这些霉菌培养检测的第一步应该是确定是否存在其他形式的产孢。如果存在，鉴定时应该首先考虑其他的产孢形式。医学上比较重要的少数霉菌以产生关节孢子作为其唯一的孢子发生方式，球孢子菌属就是如此。

粉分生孢子是从现有的菌丝的侧面或末端形成，在分隔形成的初始阶段产生，像短菌丝分支。这种形式的丝裂型分生孢子发生是皮肤癣菌[表皮癣菌属（*Epidermophyton*）、小孢子菌属（*Microsporum*）和毛癣菌属（*Trichophyton*）]的特征，也是若干双相型真菌包括皮炎芽生菌、荚膜组织胞浆菌和巴西副球孢子菌的特征。

2. 芽殖型分生孢子发生 许多真菌的进化使得它们能够反复发芽，从一个单一的产孢细胞产生大量的无性孢子。芽殖型分生孢子的发生有2种基本形式：全壁芽生型，其中产孢细胞的壁每一层都突起以形成分生孢子；内生芽殖型，其中分生孢子从产孢细胞内产生，至外层细胞壁裂开，内层通过开口向外延伸成为新孢子壁。这两种形式的芽殖型分生孢子形成可以根据孢子发生的细节进一步区分。

几乎所有产生完全分裂型分生孢子的霉菌都具有黑色的细胞壁，因此菌落外观很相似。其中分生孢子的形态特征及产孢方式是主要的区分特征。完全分裂式分生孢子的尺寸范围从微小的单细胞到大型厚壁多细胞分生孢子。在一些种中，第一个形成的分生孢子芽产生第二个，第二个再产生第三个，直到形成一连串分生孢子，最新产生的分生孢子在其顶端（向顶性）。由于每个孢子可以产生一个以上的芽，就有可能形成支链[例如，枝孢瓶霉属（*Cladophialophora*）]。在另一组中，产生第一个孢子的产孢细胞继续生长再产生第二个孢子。如此反复形成沿着延长的产孢细胞侧面排列的单孢子，称为合轴产孢，代表的种是离蠕孢属（*Bipolaris*）和明脐菌属（*Exserohilum*）。

霉菌内生芽殖型分生孢子的壁来源于产孢细胞壁的内层。这样可以从同一点产生一连串的分生孢子。内生芽殖型分生孢子有2种主要形式：一种形式是瓶梗产孢，其产生分生孢子的特殊产孢细胞被称为瓶梗（phialide），另一种形式是环痕

产孢,其产孢细胞被称为环痕梗(annellide)。

瓶梗产孢时,第一次释放出的细胞在其顶端裂开后呈囊领状,其内部的分生孢子是连续产生的。在一些种中囊领非常明显,例如,瓶霉属(*Phialophora*),而在有些种的瓶梗顶端几乎看不见。在一些瓶梗产孢的霉菌中,如镰刀菌属和枝顶孢属(*Acremonium*),分生孢子没有牢固地附着,并经常在侧面移动聚集成团环绕瓶梗。在其他瓶梗产孢的霉菌中,如曲霉属和青霉属真菌,瓶梗顶端内壁的持续更新形成一个无分支的链连接着分生孢子,最新产生的孢子在基部(向基生长)。

像瓶梗一样,环痕梗是产孢细胞在其顶端以无分支的链[如帚霉属(*Scopulariopsis*)]或湿团块状[如赛多孢霉属(*Scedosporium*)]释放分生孢子。在环痕产孢时第一次释放的细胞变成分生孢子,通过前一个孢子释放后形成的瘢痕再产生分生孢子。与瓶梗不同的是,每产生一个新孢子环痕梗的长度就随之增加。一个已产生许多分生孢子的旧环痕梗的顶端将会有许多瘢痕或环痕。

六、霉菌的鉴定

大部分霉菌可通过培养进行鉴别,但鉴别标准往往不完全等同于用于分类依据的标准。肉眼观察的特点对霉菌的鉴别通常很有帮助,如菌落形态、表面颜色、着色和增长速度。虽然培养基、培养温度、培养代数和培养液的量可影响菌落外观和生长速度,但这些特性因其足够稳定仍然可用于霉菌的鉴别。经培养不能产生孢子的霉菌可能无法使用形态学来进行鉴别,因此需要筛选出有利于孢子形成的培养条件。虽然霉菌在营养物质丰富的培养基上长势很好,如沙氏葡萄糖琼脂培养基(Sabouraud's dextrose agar),但菌丝体产生过剩经常导致孢子形成减少。在这样的情况下,将其传代培养至低营养培养基可有助于孢子形成。

七、多相性鉴定

用传统的形态学方法鉴定真菌最常出现的一个问题是无法对非产孢的微生物进行鉴别和分类。通过分析比较DNA序列,可以对大多数这样的菌株应用系统发育物种识别的概念进行鉴别和分类。用DNA测序鉴别真菌相关标准的说明已经出版[24]。

目前,许多临床实验室将DNA测序和(或)MALDI-TOF作为常规真菌鉴定规程的一部分。在形态学鉴别没有帮助的情况下,这些鉴定方法可以作为备选。这种方法尤其在如下情况比较有用,如分离株的形态不典型、不能形成孢子、需要孵育更长的时间或者在特殊的培养基中才能产孢、表型非特异或模糊、需要准确鉴定的特定菌株及需要了解特定微生物群体的暴发情况和流行病学意义。在上述的情况下,可能需要DNA测序。使用多相的方法对真菌进行鉴定,结合形态学和基因型的方法可能是目前真菌鉴定的最实用和经济高效的方式[25]。

八、常见的真菌学术语

分生孢子盘:一个开口的杯状结构,分生孢子在其上形成。

向顶生长:是指一个分生孢子链,新孢子在链的末端形成。

粉分生孢子:丝裂型分生孢子,由未分化的菌丝末端或短侧枝产生。

粉孢子:见粉分生孢子。

无性型:真菌的无性生殖形式。

环痕梗:一种专门的产孢细胞,环痕梗会产生一连串的孢子,在其顶端有相应的瘢痕。

环痕分生孢子:环痕梗产生的芽殖式分生孢子。

环痕孢子:见环痕分生孢子。

囊托:囊轴正下方孢囊的膨大部分。

附着孢:芽管或菌丝的突起,刺盘孢菌属的典型特征。

关节分生孢子:菌丝离断产生的孢子,来源于原有的菌丝断裂形成的细胞。

节孢子:见关节分生孢子。

子囊果:一个包含子囊的结构。

子囊座:见子囊果。

子囊孢子:减数分裂后在子囊内产生的单倍体孢子。

子囊：一个包含子囊孢子的薄壁囊，是子囊菌门的特征。

无隔膜：不具横隔壁或隔膜。

掷分生孢子：用力排出的分生孢子。

掷孢子：见掷分生孢子。

担子菌子实体：一个产生担子的结构。

担子果：见担子菌子实体。

担孢子：减数分裂后在担子上产生的单倍体孢子。

担孢子梗(担子)：能够产生担孢子的细胞，担子菌门的特征。

向基生长：是指一个分生孢子链，新孢子在链的基部形成。

芽殖型：分生孢子产生的2种基本形式之一，在隔膜形成前分生孢子逐渐膨大。

芽殖型分生孢子：分生孢子产生在隔膜形成前，由产孢细胞部分膨胀而成。

芽生孢子：见芽殖型分生孢子。

链状：呈链状。

脑回状：常用于描述菌落的表面形态呈迂曲状。

厚垣孢子：一个休眠期的孢子，来自于现有的菌丝细胞膨胀的结果。

分枝：由一个祖先种及其所有后代组成的一个系统发育群。分枝(和次分枝)能够在任何给定的分类级别上被识别。

棒状：棒状的，基部缩窄。

闭囊壳：封闭的子囊果，没有开口，裂开后释放子囊孢子。

腔孢纲：属人工分类的分组，指无性霉菌在一个特殊的多菌丝结构内形成分生孢子，如分生孢子盘或分生孢子器。

囊领：产孢细胞顶端的杯状结构。

囊轴：毛霉目中伸入到孢子囊中膨胀的孢囊柄部分。

孢子发生：分生孢子形成的过程。

产孢细胞：能够产生或变成分生孢子的任何细胞。

载孢体：承载分生孢子的结构。

分生孢子梗：一个特殊的菌丝或细胞，在其上或者是作为它的一部分产生分生孢子。

分生孢子：一个无性孢子。

交叉：十字交叉，常用于描述孢子隔膜。

隐蔽种：由核酸变异识别的物种，但根据其形态特征，尚未被识别为不同的物种。

楔形：一端比另一端更细小，常用于描述孢子的术语。

暗色：有暗色色素。

齿状突起：能够负荷孢子的小的齿状突起。

具离壁隔膜的分生孢子：孢子中各个细胞分别被一个不同于外层壁的囊样壁包围。

棘刺：与孢子相关的小的尖刺状结构。

内分生孢子：在菌丝内形成的分生孢子。

内生芽殖型：产孢的一种形式，在一个产孢细胞内产生的分生孢子。

真分隔：孢子分隔的内壁和外壁是连续的。

絮状：质地像棉花一样，用于描述菌落的一个术语。

纺锤形：具有纺锤样形状，用于描述孢子的术语。

膝状的：全壁芽生式霉菌形成的一个不规则的产孢细胞，如膝状弯曲。

无毛的：具有蜡样质地，用于描述菌落的术语。

裸囊壳：子囊分布于子囊果内松散的菌丝网中。

雌雄异株：自交不育的，雌雄异体的真菌不能够进行有性繁殖，除非两个相对应的交配菌株同时存在。

脐：在分生孢子的基部略微突出的瘢痕。

全壁芽生式：产孢的一种形式，产孢细胞的内外壁均肿胀以形成分生孢子。

雌雄同株：自交可育的，雌雄同株真菌的有性繁殖可发生在独立的个体内。

壳细胞：存在于一些曲霉菌属中的较大、壁厚、不育细胞。

透明的：无色的、透明的、晶莹剔透的。

菌丝：组成真菌菌丝体的独立的细丝状结构。

大分生孢子：真菌以同样的方式产生的两个不同大小的分生孢子中较大的那个孢子。

柱孢子囊：从孢囊梗的末端向外生长的圆柱状孢子囊，其内链状孢囊孢子产生，是共头霉属的特征。

分生组织的：通过各方向共同促进分隔形成持续增加生物量。

梗基：能够支撑瓶梗的分生孢子梗的分支，曲

霉属和青霉属的特征。

小分生孢子：真菌以同样的方式产生的两个不同大小的分生孢子中较小的那个孢子。

有丝分裂孢子真菌：用于描述一类无性真菌的术语。

霉菌：丝状真菌。

淡色的：透明的，颜色较浅的。

砖格状细胞：组织中发现的厚壁、暗色细胞，由着色芽生菌病引起。

菌丝体：由大量的增殖生长的真菌分支细丝组成。

寡核细胞：拥有几个胞核的细胞。

卵孢子：卵菌门真菌产生的有性孢子。

孔口：一个开口，通过这个孔口孢子能够从子囊果或者分生孢子器中释放出来。

寡具隔膜：隔膜较少。

子囊壳：一个瓶型的子囊果，顶端有孔口，子囊孢子能够通过孔口释放出来。

瓶梗：一个特殊的产孢细胞，该产孢细胞能够产生一连串的孢子。

多无性型：术语，用来描述一种真菌有一个以上的无性型。

多形性：用于描述非产孢菌株真菌的术语。

假菌丝：一连串的酵母细胞，由于酵母细胞出芽后黏附不脱离，形成了细长的菌丝状细丝。

点状的：用小点做标记，通常用于描述菌落。

器生分生孢子：分生孢子器内形成的分生孢子。

分生孢子器：一个瓶型的结构，顶端有孔口，分生孢子在孔口内产生。

梨形的：像梨一样的形状。

假根：很像树根的短的、分支状菌丝。

硬壳细胞：见砖格状细胞。

菌核：菌丝的实性团块，通常没有孢子。

有隔膜的：有横隔壁或隔膜。

隔膜：真菌菌丝或孢子的横隔壁。

无梗的：没有干、茎。

同胞种：拥有相同的，最近的共同祖先的物种。

复合种：一个具有同等临床意义的单系分枝。

小孢子囊：见小型孢子囊。

小型孢子囊：一个小的孢子囊，内含少量的无性孢子，毛霉目的特征。

孢囊梗：专门产生孢子囊的菌丝。

孢囊孢子：孢子囊产生的无性孢子，球囊菌门的特征。

孢子囊：一个含有无性孢子的封闭的囊样结构，球囊菌门的特征。该术语也可指於澡菌界的成员的分隔菌丝结构，不是指含有游动孢子的囊泡，分隔菌丝来源于芽管，发展成终末囊泡后里面的游动孢子破裂。

分生孢子盘：一个特殊的能够产生致密的短分生孢子的结构。

子座：坚硬的团块状菌丝，有时在短的分生孢子梗上有孢子，或有子囊果和分生孢子器着生。

合轴式：沿着一个细长的产孢细胞不同位点连续产生分生孢子。

共无性型：任何 2 个或 2 个以上的无性型具有共同的有性型。

束丝：一组紧密直立的或融合的分生孢子梗，分生孢子在其顶端，或沿着两侧的上部，或两个部位都有。

有性型：真菌的有性繁殖形式。

丝裂型：2 种基本的产孢形式之一，隔膜形成后分生孢子开始增大。

叶状体：真菌的增殖生长。

顶囊（囊泡）：曲霉属分生孢子梗膨胀的顶端，或者是其他真菌产孢细胞膨出的部分。

绒毛状：被覆长毛，用来描述孢子的术语。

酵母菌：单细胞的出芽真菌。

游动孢子：一个活动的无性孢子。

接合孢子：球囊菌门产生的厚壁有性孢子。

本章节的发现和结论为作者所有，不代表 CDC 的观点。稿件中产品名字的使用并不意味着美国卫生和人类服务部为其代言。

参考文献请扫二维码查阅

第117章　真菌学标本的采集、运送和处理

ELIZABETH L. BERKOW, KARIN L. MCGOWAN

（黄磊　译；福泉、李若瑜　审校）

一、标本采集和运送

与细菌学一样，优秀的真菌学实验室的目标是准确分离和鉴定可疑引起感染的真菌。本书有义务为正确的标本选择、采集和运送提供指南。表117-1列举了最常用于真菌培养的标本类型[1-3]，见图117-1。正确采集标本后，所有标本应置于防渗漏的无菌容器中运送，并尽快处理。厌氧运送培养基和厌氧容器不可用于真菌。真菌的适应性很强，但由于某些真菌在高于37℃或低于10℃的环境中生长会受影响，因此，推荐在室温下运送。皮肤癣菌对低温尤其敏感。除皮肤、毛发、甲外，含有正常细菌菌群的标本应尽快运送，因为细菌过度生长会抑制慢生长的真菌，并降低真菌的生存力。如此类标本不能在2 h内运送至实验室，则应储存于4℃环境。

表117-1　标本采集和运送指南[a]

标本类型	采集流程	处理流程	运送时间和温度	备注
脓肿（引流物、渗出液、脓液、伤口）	用70%乙醇清理表面，用无菌针和注射器采集感染灶外周边缘，如为开放性，用拭子或吸取物	如黏稠，进行类似痰标本的预处理	如≤2 h，室温	寻找谷粒或颗粒样物质，如存在则记录颜色
血液	取样前用碘酊或氯已定消毒皮肤[2]。使用所用系统推荐的最大采血量	人工	如≤2 h，室温；如更长，室温	所有针对细菌的检测系统可检出除马拉色菌属外的所有酵母菌，但不能检出霉菌。自动化系统配套的特殊真菌培养基适用于霉菌
		双相（Septi-Chek）	如≤2 h，室温；如更长，室温	
		自动化[BACTEC（BD Diagnostics, Sparks, MD），BacT/ALERT（bioMérieux, Durham, NC），VersaTREK（TREK Diagnostic Systems, Cleveland, OH）]	如≤2 h，室温；如更长，室温	
		溶解-离心（人工或分离管）	如≤2 h，室温；如更长，室温≤16 h内完成	溶解-离心系统适合检测霉菌，尤其是引起地方性真菌病相关霉菌。但污染率和假阳性率高

（续　表）

标本类型	采集流程	处理流程	运送时间和温度	备注
骨髓	用肝素化的注射器或溶解-离心管，采用无菌技术收集	凝固的骨髓为不合格标本	如≤15 min，室温； 如更长，室温	儿童分离管最佳
导管尖端（血管内置管）	移除导管末端 3～5 cm，置于无菌容器内	Maki 法[39]；用于导管尖端，用于真菌尚未验证	如≤15 min，室温； 如更长，4℃	避免含放线菌酮培养基
表皮标本（毛发，皮肤，甲）	所有类型样本应使用 70% 酒精消毒 毛发：发根为最重要部分，建议拔除；送检 10～12 根毛发，放置于无菌干燥容器或信封中 皮肤：刀片或玻璃片钝缘刮取，或软毛牙刷环形用力刷取 甲：刀片剪取或刮取。甲下组织也应刮取。无菌容器或干净、干燥信封送检	仅从病损的边缘部位取材，因病损中央通常已无活力 所有标本均应使用无菌拭子轻压于琼脂上；不要在平板上划线。如用牙刷取材，也应轻压在琼脂上	如≤72 h，室温；避免冷藏，因为皮肤癣菌对寒冷敏感	选择伍德灯下产生荧光的毛发 毛发和皮肤可用柔软牙刷采样 对于花斑糠疹（糠秕马拉色菌），橄榄油或浸泡橄榄油的纸片应置于琼脂平板的第一象限
眼（角膜刮取物、玻璃体液）	角膜刮取物：由医生取材，直接接种于平板/玻片	角膜："X"或"C"形接种于非选择性培养基	如≤15 min，室温； 如更长，室温	通常取材量很少。避免使用含放线菌酮的培养基
	玻璃体液：针吸	玻璃体液：离心浓缩，沉淀物接种培养基或涂布	如≤15 min，室温； 如更长，室温	
医疗器械	外科手术取材。无菌容器运输	用无菌刀片采集（刮取）生物膜或营养生长体	如≤15 min，室温； 如更长，4℃	避免使用含放线菌酮的培养基。器械材料最好用液体培养基检测
前列腺液	让患者排空膀胱，按摩前列腺以产生前列腺液	直接接种培养基或用无菌广口容器运输	如≤15 min，室温； 如更长，室温	液体均应于显微镜下检测。按摩后的首次尿阳性率较高。最适于检测地方性流行性真菌病
下呼吸道（痰、支气管吸取物、肺泡灌洗液）	采集刷牙后清晨第一次痰，外科方法采集支气管毛刷或支气管肺泡灌洗液（BAL）。将所有标本置于无菌容器内。接种于含抗生素（有或无放线菌酮）的培养基	黏稠的下呼吸道标本应行预处理，并离心以浓缩成分	如≤15 min，室温； 如更长，4℃	唾液和 24 h 痰为不合格标本。去除分枝杆菌污染的方法不可行
上呼吸道（口腔、口咽部和窦道标本）	拭子取口腔病灶，避免碰到舌头。用细线或可活动拭子取口咽部标本，外科方法取窦道内容物	口腔和口咽部标本采用拭子运输系统转运。窦道内容物置于无菌容器中	口腔：如≤2 h，室温；如更长，室温 窦道：如≤15 min，室温；如更长，室温	选择培养基和显色培养基最适合检测念珠菌
无菌体液（脑脊液、心包积液、腹腔积液和关节滑囊液）	采样同细菌学检查，离心浓缩后，沉淀物接种培养基。凝块应研磨	除脑脊液（CSF）外，将无菌体液置于含肝素的无菌真空采血管或溶解-离心管，以防止血液凝固。除脑脊液外，血培养瓶可用于检测真菌	如≤15 min，室温； 如更长，室温； 不可冷藏	显微镜下检查无菌体液沉淀。如样本体积≤2 ml，直接涂布平板，每个平板上涂尽量多的液体

（续　表）

标本类型	采集流程	处理流程	运送时间和温度	备注
粪便	不推荐送检此类标本			
组织	外科方法采集，需要比细菌学检查更大量的标本	用无菌容器；保持湿润（加入几滴盐水）以防止干燥。十分重要的是：应切碎而非研磨（荚膜组织胞浆菌除外）。组织碎片应按压在琼脂平板上，使部分嵌入琼脂。分离荚膜组织胞浆菌需研磨组织	如≤15 min，室温；如更长，室温	对侵袭性真菌病，推荐组织活检。检查皮下组织是否有颗粒状物质（见脓肿部分）
尿	清晨第一次清洁尿，耻骨上或导尿管取样；24 h 尿不合格	无菌容器或尿转运系统。离心浓缩标本，沉淀物进行接种	如≤2 h，室温 如更长，4℃；尿转运系统可在室温下最长放置 72 h	显色培养基最适于念珠菌。使用沉淀物行显微镜检查
阴道	同细菌学采样方法	拭子转运系统，或用于洗涤物的无菌容器	如≤2 h，室温 如更长，室温	含抗生素的培养基或显色琼脂平板最适于分离念珠菌

注：[a]BAL. 支气管肺泡灌洗液



图 117-1　用牙刷接种于海藻糖琼脂后，皮肤癣菌（苏丹毛癣菌）在有氧环境下 30℃孵育 4 天后的菌落生长情况（该图片由 Marilyn A. Leet 惠赠，作者来自费城儿童医院，费城），见彩插

与其他感染性疾病一样，确定病原体的最佳标本来自活动性感染部位（如脑脊液标本用于诊断脑膜炎）。然而对于很多真菌感染疾病，病灶周围标本和活动性感染部位的标本均有用。表 117-2 列举了与不同致病性真菌相关的临床分离部位。当怀疑特定真菌引起的疾病时，实验室应该建议临床采集外周标本。例如，当怀疑地方性真菌病时，前列腺液（prostate fluid）是良好的高回收率标本，但通常不会送检[4-8]。

真菌标本的很多采集和运送步骤指南与细菌类似。对于两者的不同点在于，将这些内容告知医生和护士十分重要。不同点之一是标本量，真菌培养的标本量通常大于细菌，这是因为很多标本（体液、呼吸道分泌物等）在涂布平板之前需要浓缩或预处理，以提高真菌分离率。总体而言，除了表 117-1 中标注的某些特定部位，棉拭子取材的标本不适合分离真菌，因此不建议拭子采样。

应鼓励真菌实验室向医生提供多种真菌培养方式。用于初代分离的培养基选择，以及培养时长和温度依据不同的培养需求而异。笔者实验室的真菌培养选择包括：针对毛发、皮肤和甲标本的皮肤癣菌培养；针对阴道、尿、皮肤和喉部标本的念珠菌排除性培养；真菌的血培养[细胞溶解-离心培养（lysis-centrifugation culture）]；真菌的全项培养。通过选择不同的培养类型，医生可提示实验室可疑的病原体，从而减少实验室培养所需的时间。

表 117-2 实验室分离致病性真菌的常见临床分离部位

疾病	分离的标本[a]														
	血液	骨	骨髓	脑	脑脊液	眼	毛发	甲	关节液	前列腺液	下呼吸道	窦道/鼻腔	皮肤[b]	组织	尿
曲霉病		X		X		X		X			X	X	X	X	X
芽生菌病		X		X	X				X	X	X	X	X	X	X
念珠菌病	X	X	X	X	X	X		X	X	X	X	X	X	X	X
着色真菌病				X								X	X	X	
球孢子菌病	X	X	X	X	X				X	X	X	X	X	X	X
隐球菌病	X	X	X	X	X	X					X		X	X	X
镰刀菌病(透明丝孢霉病)	X		X	X		X		X	X		X	X	X	X	
组织胞浆菌病	X	X	X	X	X	X					X		X	X	X
毛霉病/虫霉病		X		X		X					X	X	X	X	
副球孢子菌病	X		X	X	X					X	X	X	X	X	
青霉病/马尔内菲篮状菌病	X	X	X	X					X				X	X	X
肺孢子菌病		X	X								X			X	
假霉样真菌病/赛多孢子菌病	X		X		X	X					X		X	X	
孢子丝菌病	X	X			X						X	X	X	X	
毛孢子菌病	X	X	X	X	X	X			X	X	X	X	X	X	X

注：[a]X. 真菌分离自指定的部位；[b] 包括皮肤和黏膜

二、标本制备、预处理和安全

如果实验室因某些原因接收到不合格的标本，应拒收并通知相应的医生。低质量的标本会导致错误的信息，包括假阴性结果。根据联合委员会(在美国的一个独立组织，来授权和认证医疗保健体系，曾称 JCAHO)的要求，每一份标本必须附有申请单，申请单必须包括以下信息：患者姓名、年龄、性别、住址、医生姓名、具体取材部位、标本采集的日期和时间、采集者的姓名、患者临床诊断和特殊的培养需求。此外，每份标本必须有牢固粘贴的标签，标注患者的姓名、位置、医生的姓名、采集日期和时间[9]。

各种类型标本的预处理对于提高真菌分离率十分必要[2-3]。预处理虽然会耗费额外的时间和人力，但可以使实验室最大限度地利用每一份送检的标本，尤其是那些很难从患者获得的标本。预处理步骤列举在表 117-3 中，包括：离心尿和无菌体液标本；剪碎指甲和组织；溶解并离心分离管中的血液或骨髓标本；黏液溶解剂溶解后离心呼吸道分泌物。上述方式可以释放胞内真菌，浓集标本内真菌，并通过黏液溶解剂，例如，N-乙酰-L-半胱氨酸、5%草酸或二硫苏糖醇(dithiothreitol，Sputolysin)，帮助减少或清除污染标本中的细菌。

真菌实验室所有工作应尽可能在经过认证的 2 级层流生物安全操作台中进行。建议实验室人员处理可能含有双相真菌和其他可能的致病性真菌时，应在生物安全 2 级环境中操作。处理标本和培养物时应戴手套。显微镜检查临床标本技术很多，将在本书后文讨论。

表 117-3　接种平板前对临床标本进行的预处理

标本	预处理	备注
脓肿、引流液、脓汁、颗粒组织	颗粒组织应冲洗然后压碎；其他材料应 2000×*g* 离心 10 min	对最佳分离很重要
血液、骨髓	分离管内裂解后 3000×*g* 离心 30 min，使用 35°固定角度的转子或摆动篮	对检出荚膜组织胞浆菌和其他双相真菌很重要
体液	2000×*g* 离心 10 min，或用膜过滤	体积≥1 ml 时可达到最佳的分离率；凝血块应被去除
甲	剪成细小碎片；将碎屑接种到琼脂上	对最大限度检出皮肤癣菌很重要
呼吸道分泌物（支气管肺泡灌洗液、痰）	用化痰剂[a] 溶解，然后 2000×*g* 离心 10 min	对耶氏肺孢子菌非常重要；也提高了对其他真菌的分离率
组织	剪为细小碎片或用研钵研磨；将碎片压于琼脂上	对达到最佳分离率非常重要；剪碎最适用于接合菌和其他霉菌；研磨最适合于荚膜组织胞浆菌
尿	2000×*g* 离心 10 min	对达到最佳分离率非常重要，尤其对深部真菌

注：[a] N-乙酰-L-半胱氨酸、5%草酸或二硫苏糖醇（痰溶解剂）

三、标本处理和培养指南

（一）脓肿标本（引流液、渗出液、脓和伤口）

脓肿标本应取材自开放脓肿的活动性边缘，或用注射器吸取自封闭脓肿。脓肿、脓液或引流液应使用解剖显微镜检查谷粒或颗粒（granules）样物质。存在谷粒或颗粒样物质提示足菌肿（mycetoma），将在本书第 128 章有更长篇幅来讨论。如无颗粒，可将标本直接接种于培养基。如果标本很黏稠，应该进行与痰类似的预处理。如果有谷粒或颗粒样物质，应将其从标本中挑出，用无菌蒸馏水、无菌盐水或其他含抗生素的溶液冲洗，并备注和记录颗粒颜色。取少量上述标本放置于两张玻片之间压碎，显微镜检查是否有菌丝存在。真菌的真菌丝和细菌（分枝的革兰阳性杆菌）均可观察到颗粒。如果看到分枝的革兰阳性杆菌，应行改良抗酸染色寻找诺卡菌，并另取少量谷粒或颗粒样物质采用无菌技术压碎（无菌玻璃棒，或研钵和研杵），然后直接接种于培养基[10]。

（二）血液标本

真菌血症是住院患者发病率和死亡率的主要原因，其中念珠菌属是最主要的病原体[11-12]。早期检出血流中的微生物具有重要意义，这预示着发生血流播散性疾病。与细菌学相同，采血量、血液/液体培养基体积比和血培养次数均为重要影响因素，其中采血量为最关键的变量。对于成人，建议每次采血 20～30 ml，平均分配至 2 个血培养瓶中，这样才能用最短的时间获得最高的分离率[13-16]。有研究推荐血液在液体培养基中进行 5～10 倍稀释，稀释度小于 1∶5时会导致微生物分离率降低[11,17]。对于婴儿和儿童，目前推荐依据患儿体重计算总采血量[17-19]。由于真菌血症几乎总是持续存在，因此采集真菌血培养的时机不是那么重要[14,20]。在获取血培养前，用碘酊或洗必泰进行皮肤消毒是有效的[21]。

目前血培养有很多种类，包括手工的、双相性的、自动化的和连续监测方法，但尚无单一商品化的检测方法或培养基能够检测出所有可能的血液病原体。如果使用手工血培养，双向性系统（biphasic system）最适合真菌，并且每次检查培养瓶时都要用液体培养基-血液混合物重新冲洗琼脂斜面。也有很多自动化的连续监测系统，其中有些进行了培养基改良以更好地促进真菌生长，包括 BACTEC、BacT/ALERT 3D 和 VersaTREK 血培养系统。使用以上系统配套的真菌瓶能确保检测真菌血症的敏感性最高[22]。上述血培养方法的评估研究表明，这些方法能检测到除了非厚皮马拉色菌（*non-pachydermatis Malassezia*）外的所有致病性酵母菌属[23]。即使没有特定的真菌培养瓶，自动化的连续监测系统也能分离念珠菌属、隐球菌属、红酵母和毛孢子菌属，其敏感性等同或高于手工法或“溶解-离心”方法（lysis-centrifugation method）[13-14,24-31]。然而，常规细菌培养瓶及其配套的自动化系统不能满足霉菌和诺卡菌属的培养条件[31]。

手工或商品化分离收集系统完成的“溶解-离心”法是检测霉菌和双相真菌(如荚膜组织胞浆菌)更加灵敏的方法[14,31-32]。然而,由于其高污染率、高假阳性率,一些研究不赞成对所有真菌血培养常规使用“溶解-离心”法。并且与自动化系统相比,此方法检出酵母菌的时间与之相当或更短[25-26,33]。如怀疑霉菌感染,应选择自动化系统配套的特殊真菌培养基,如 BACTEC MYCO/Flytic medium 或 BacT/ALERT MB,或“溶解-离心”法[34]。置于成人或儿童分离管中的血液应在处理前室温存放,理想情况下应在采样后 16 h 内处理。溶解-离心后的沉淀物应划线接种于多种不含放线菌酮的增菌培养基和巧克力琼脂平板[35]。酵母菌属中亲脂性的马拉色菌属(例如糠秕马拉色菌),生长需要脂类,应特殊处理[23]:在固体培养基上铺一薄层橄榄油,或在传代培养平板或含溶解-离心后沉淀的平板上放置一浸润橄榄油的纸片[10,17,36]。如能获得改良 Dixon 培养基(modified Dixon's media)、Leeming 培养基(Leeming media)、Ushijima 培养基(Ushijima's media)等特殊培养基,也可用于分离马拉色菌。

(三)骨髓

骨髓最适用于诊断播散性念珠菌病、隐球菌病和组织胞浆菌病。应使用无菌技术在肝素化注射器或儿童分离管中采集约 0.5 ml(儿童)或 3 ml(成人)骨髓。由于“溶解-离心”过程可增加荚膜组织胞浆菌和其他霉菌的分离率,可以选择使用分离管分离此类真菌。已凝固的骨髓为不合格标本。除了荚膜组织胞浆菌,免疫力正常宿主的骨髓吸取物中极少能发现真菌。然而对于免疫缺陷患者,骨髓是非常好的标本,曲霉菌、念珠菌、隐球菌、荚膜组织胞浆菌和马尔尼菲篮状菌都能从中被发现[37]。显微镜检吉姆萨染色(Giemsa stain)骨髓片的诊断价值明确,最近的数据表明,其他侵袭性更小的检测方法(如血培养、骨髓吸取物培养)价值有限,仅应有选择性地使用[38]。骨髓不应放入血培养瓶中,因为骨髓中大量白细胞产生二氧化碳,会导致在连续监测系统中标本很快出现假阳性结果。

(四)导管尖端(血管内置管)

如与血培养同时进行,定量细菌和真菌培养则可以表示导管尖端(catheter tip)定植情况。合格标本为留取静脉内或动脉内置管导管尖末端 3~5 mm 送至实验室培养。标本应置于无菌容器内,在室温下运输并储存[39]。尽管也可以使用定量培养技术(超声法),但 Maki 半定量法(semi-quantitative method of Maki et al)为临床实验室最常用的方法,导管尖在琼脂平板表面滚动 4 次,培养出的菌落数量≥15 个为阳性[40]。半定量法可区分感染(≥15 个菌落)和污染标本,在诊断导管相关性脓毒症中,是较在液体培养基中培养导管尖端更为特异的方法。

(五)皮肤标本(毛发、皮肤、指甲)

1. 毛发 毛发根部是用于分离培养真菌最重要的部位,因此建议拔除或拉出毛发,而非将其剪断。取材部位用 70%乙醇擦拭,待其干燥。感染的毛发表现枯燥、折断或褪色,也可选择在伍德灯下产生荧光的毛发送培养。送检的毛发应置于无菌容器内或清洁干燥的纸信封内。毛发还可以用软鬃毛牙刷环形摩擦脱发处边缘或脱发斑片处进行收集[41]。

2. 皮肤 用 70%乙醇擦拭取样区域,待其干燥,用刀片钝缘或载玻片刮取皮肤标本,或用软鬃毛牙刷环形用力刷取患处[41]。由于真菌在皮肤病灶中央通常不能存活,应从病灶的活动边缘取材。皮肤应使用无菌容器或清洁干燥的纸信封或牙刷送检。

3. 甲 甲应使用 70%乙醇擦拭取样区域,然后用刀片切取或刮取。如果取材部位在甲前缘,应在刮取后置于无菌容器或专用的纸质信封送检。在接种平板之前,甲碎片应压成细粉或用刀片切为碎屑。

所有皮肤标本均应使用无菌棉拭子或刀片轻压于接种琼脂平板上接种。将碎屑在琼脂表面分布均匀,不要用接种环在平板上划线。如果使用牙刷取皮肤和(或)毛发标本,应将牙刷轻按于琼脂平板表面 4~5 个位置,并留下印迹,如有微生物存在,则会在鬃毛印迹内生长。皮肤标本经常会被细菌污染,因此,检测皮肤真菌应使用抑菌培养基(含有氯霉素和放线菌酮),如 Mycosel。但由于引起白癣的毛孢子菌属、引起黑毛结节病的何德毛结节菌(*Piedraia hortae*)、引起黑癣的威尼克何德霉(*Hortaea werneckii*)、引起甲和皮肤感染的新双间柱顶孢(*Neoscytalidium dimidiatum*)对氯霉素和放线菌酮敏感,因此,怀疑有

这些感染的患者毛发和皮肤标本应使用非抑菌培养基(如沙氏葡萄糖琼脂)进行培养。更常引起甲感染的非皮肤真菌(如帚霉属和镰刀菌属)也对放线菌酮敏感,所以对所有甲标本应同时使用抑菌培养基和非抑菌培养基来培养。对怀疑由糠秕马拉色菌引起的花斑糠疹患者,直接显微镜检查常具有诊断意义,非抑菌培养基例如沙氏葡萄糖琼脂可用于接种培养,将橄榄油或浸满橄榄油的纸片置于平板的第一象限。糠秕马拉色菌在≥35℃时生长最佳,但在 30℃ 也能生长。皮肤癣菌对低温敏感,因此皮肤标本不能冷藏。

(六)眼标本(角膜刮取物和玻璃体液)

几种类型的眼部感染需要由眼科医生获取角膜刮取物(corneal scrapings)和(或)玻璃体液(vitreous humor)。这些感染包括真菌性角膜炎、真菌性眼内炎和扩展的眼真菌病。真菌性角膜炎为角膜感染,最常见的病原体为枝顶孢霉属、曲霉属、白念珠菌、近平滑念珠菌、热带念珠菌、弯孢霉属和镰刀菌属[42-43]。真菌性眼内炎是系统性真菌感染血行播散的晚期阶段,可涉及眼部多种结构和周围组织。最常见的病原是曲霉属、皮炎芽生菌、念珠菌属、新型隐球菌、球孢子菌属、荚膜组织胞浆菌、巴西副球孢子菌和申克孢子丝菌[42-43]。扩展的眼真菌病由鼻脑毛霉菌病引起,与真菌性眼内炎类似,可累及眼部多种结构和周围组织。此类感染的诊断需要尽可能在显微镜下找到病原体,并有阳性培养结果。角膜刮取物由医生取材,用高温灭菌的铂金刮刀直接接种于培养基[44]。由于存在角膜变薄和穿孔的危险,通常仅取很少量标本。应指导医生将标本首先直接接种于非抑菌培养基,如沙氏葡萄糖琼脂(Sabouraud dextrose agar),然后在无菌玻片(在中央位置)上放置部分标本进行染色。刮取物应以"X"或"C"形接种于平板上 2~3 个位置[3]。接种的平板应保存于室温,并立即运送至实验室。玻璃体或玻璃体液是填充于晶状体和视网膜之间的清澈、凝胶状物质。由医生取材时,玻璃体液通常被冲洗液稀释,因此需要进行离心浓缩,然后用沉淀物接种培养基并制片。标本应接种于沙氏葡萄糖琼脂,霉菌抑菌性琼脂(inhibitory mold agar)和(或)含 10% 羊血的心脑浸液(brain heart infusion,BHI)琼脂,30℃ 孵育。应避免使用含放线菌酮(cycloheximide)的培养基[42-43,45]。

(七)医疗器械

多种医疗器械(medical devices)(隐形眼镜、支架、伤口治疗用敷料、避孕用具、外科植入物、人工关节等)都可送检真菌培养。很多是由外科取材,并放置于无菌容器,在室温下运送和保存。每份标本都应检查是否有真菌成分和生物膜生长,如果有的话,应使用无菌刀片将标本从器械上刮下,直接接种于琼脂培养基或液体培养基[3]。标本应接种于沙氏葡萄糖琼脂、霉菌抑制琼脂和(或)含 10% 羊血的 BHI 琼脂,并在 30℃ 孵育。应避免使用含放线菌酮的培养基。如果生物膜或真菌成分生长的区域不是很明显,应将器械的一部分置于液体培养基,如 BHI 肉汤,然后 30℃ 孵育。也可使用定量(超声)肉汤培养的方法。

(八)前列腺液

前列腺液由睾丸、精囊、前列腺和尿道球腺的分泌物组成。膀胱排空后,按摩前列腺可产生纯前列腺液。血流中的微生物通常会播散至前列腺。患有地方性真菌病的男性患者一个重要临床特征是主诉慢性尿路感染史,而尿培养阴性。此类患者前列腺液真菌培养经常阳性。分泌物也应行显微镜检查。获得前列腺液后,应再取尿标本做培养,因为尿中菌量更高[4-8]。

(九)下呼吸道标本(痰、支气管吸出物、支气管肺泡灌洗液)

患者刷牙后,应留取清晨首次痰。唾液标本和 24 h 痰标本均不可用作真菌培养。黏性的下呼吸道标本在常规操作前需进行预处理。用溶黏蛋白剂,例如,N-乙酰-L-半胱氨酸、5% 草酸或二硫苏糖醇(Sputolysin,Millipore Sigma,Burlington,MA)溶解痰,然后 $2000\times g$ 离心 10 min,沉淀物接种平板。这种方法可极大地增加菌浓度,提高真菌的分离率。氢氧化钠溶液可用于浓缩分枝杆菌标本,但会抑制很多真菌生长(如曲霉属),因此不适用。此外,离心增加了沉淀物中细菌的数量,因此应选择含抗生素的培养基(含或不含放线菌酮)。与细菌学类似,下呼吸道标本应检查是否存在血性、脓或坏死成分,这些成分中菌量很高[46-47]。念珠菌属是囊性纤维化患者呼吸道标本中最常分离到的真菌,因此推荐使用

念珠菌选择性和鉴别性的显色培养基(chromogenic medium)[48]。赛多孢霉属是目前与囊性纤维化相关的第二常见的霉菌,使用赛多孢霉属选择性培养基(Scedosporium-selective medium)(含有抗真菌药物氯硝胺和苯菌灵),可提高患者人群中霉菌的分离率[49]。

(十)上呼吸道标本(口腔和口咽部标本)

用于送检真菌培养的牙龈黏膜层、口腔病灶和口咽部标本通常需要筛查念珠菌病。当怀疑鹅口疮时,应使用湿拭子轻刮患处送显微镜检查,并做排除性真菌培养。标本应接种于针对念珠菌的含抗生素培养基或显色琼脂。培养对诊断念珠菌病不是必须的,但如果门诊无显微镜检查条件,或怀疑念珠菌以外的其他真菌时,可进行培养。在极少情况下,口腔病灶可见于组织胞浆菌病或副球孢子菌病,但表现不同于念珠菌属病。如果怀疑以上病原体,应进行全套的真菌培养和显微镜涂片检查。鼻腔中可能存在环境孢子污染,会导致培养的结果解释困难,因此不推荐使用鼻拭子。鼻组织和鼻窦冲洗物是很好的标本,但回收的很多重要病原体(如曲霉菌属)对放线菌酮敏感,因此,应接种于多种含抗生素而不含放线菌酮的培养基[50]。

(十一)无菌体液标本(脑脊液、心包积液、腹水、和关节滑液)

除脑脊液(cerebrospinal fluid,CSF)外,无菌体液常置于无菌的真空试管中,管内含肝素以阻止血液凝固,也可使用"溶解-离心"的分离管。标本体积≥2 ml,这些试管和脑脊液腰椎穿刺管应 2 000×g 离心 10 min,沉淀物接种培养基,上清液可用于血清学检查[45]。当标本体积≤2 ml时,标本应直接接种,在每块平板上用尽量多的液体。推荐使用细胞离心涂片机(Cytospin centrifuge)制备显微镜检查用涂片[51-52]。由于无菌体液真菌培养很少阳性,很多实验室用带螺旋盖的斜面培养基代替平板接种,从而避免可能的污染问题。一些国家处理无菌体液或组织标本时,会在生物安全柜中放置一个清洁平板,如此平板上有微生物生长则提示处理过程中有污染事件发生。

(十二)粪便标本

不推荐送检粪便标本用于常规真菌培养。很多念珠菌属是粪便正常菌群的一部分。任何破坏正常胃肠道菌群的情况,如食物中存在或服用抗生素,在粪便培养时会显示真菌占优势。真菌定植或真菌占优势均不表示发生念珠菌引起的侵袭性疾病。如果怀疑胃肠道侵袭性真菌感染疾病,应行结肠镜检查和组织病理活检[53-54]。

(十三)组织标本

除荚膜组织胞浆菌外,组织中的真菌在剪碎(mince)组织后(但应避免研磨)可获得最佳分离率。尤其对于毛霉类霉菌,剪碎对检出组织内微生物十分重要。使用刀片切碎组织,而后将组织碎片压在培养基上,使其部分嵌入培养基内[55],见图 117-2。每个培养基应接种 2～4 份组织碎片,不应在平板上用无菌环进一步划线。使用这种接种方式,真菌会直接从组织碎片中生长出来。而对于琼脂平板上生长的菌是否为污染菌的质疑,当菌直接从组织碎片中生长出来,毫无疑问是有意义的。可以取部分标本研磨后显微镜观察和(或)涂片。

荚膜组织胞浆菌为胞内菌,需要从胞内释放才能在培养基上生长,因此当怀疑荚膜组织胞浆菌时,应研磨(ground,注:此处为 grind 的过去分词)组织或制成匀浆。如有必要,可加入少量无菌



图 117-2　将组织碎片埋入含庆大霉素的沙氏葡萄糖琼脂在有氧环境下 30℃ 培养后,马尔尼菲篮状菌的早期生长情况(该图片由 Marilyn A. Leet 惠赠,作者来自费城儿童医院,费城),见彩插

肉汤或蒸馏水以便于研磨。应检查皮下组织中是否有颗粒样物质存在(详见前文,脓肿部分)。匀浆或组织碎片应接种于含有抗生素的增菌培养基,对于系统性真菌病,增菌培养基最好同时含有血液和抗生素。

(十四)尿标本

取清晨第一次尿标本,可以是清洁尿、耻骨弓上穿刺尿或导管尿。尤其对于深部真菌病,大量尿(10～50 ml)会得到最佳的结果,并应通过离心获得最高的分离率。尿应 2000×g 离心 10 min。沉淀物用于显微镜检查和接种培养基。细菌学中使用的微生物计数不适用于真菌定量[36]。24 h 尿标本为不合格标本。

(十五)阴道标本

阴道标本(vaginal specimens)的真菌培养通常仅筛查阴道念珠菌病。因此,使用念珠菌的排除性培养方法对临床医生和实验室技术员均有帮助。念珠菌属是阴道正常菌群的一部分,仅检测到其存在没有意义。如果有相应的临床症状,再加阳性的显微镜检查或培养结果,则可以诊断阴道念珠菌病。阴道念珠菌病无需培养确诊,但显微镜检查不是任何情况下均可行,而培养则可以。培养时应接种于念珠菌属专用的含抗生素培养基(antibacterial media)或显色琼脂(chromogenic agars)。在少数情况下,组织胞浆菌病或副球孢子菌病可见阴道病灶,且不同于念珠菌属所致病灶。如有怀疑,应做全套的真菌培养和显微镜涂片检查。

参考文献请扫二维码查阅

第118章　真菌学试剂、染色剂和培养基*

MARK D. LINDSLEY

（黄磊　译；福泉、李若瑜　审校）

真菌学实验室可使用多种染色剂、培养基和试剂，以检测、分离、描述、鉴定酵母菌和霉菌。在处理可疑真菌病患者的标本时，熟悉以上材料的组分和特性对诊断操作十分重要。

对正确染色的临床标本进行直接显微镜检查(direct microscopic examination)是快速、性价比高的方法，可初步推测病原体的鉴定，来指导实验室选择最适合真菌生长和体外产孢的培养基[1-3]。真菌培养物染色镜检是最终的确定性鉴定所必须的。很重要的是当处理患者样本时应遵循全面的防护措施，尤其是当处理可能含有经血液传播病原体、人类免疫缺陷病毒、乙肝病毒、丙肝病毒的血液或无菌体液时，应在生物安全柜(生物安全2级)中操作[4-6]。应在生物安全2级条件下处理和鉴定霉菌菌落，这可减少培养物的交叉污染，保护实验室环境，防止暴露于潜在的有害物质。然而不同国家有不同的生物安全要求。

当怀疑环境样本，例如，土壤中含有传染性的组织胞浆菌属、芽生菌属或球孢子菌属的霉菌相时，应在生物安全3级的条件下进行培养和操作[6]。同样的，应在生物安全3级条件下操作任何来源(患者或环境)的已知组织胞浆菌属、芽生菌属或球孢子菌属的霉菌相的菌落。

对临床标本的初代真菌接种和培养有很多培养基可供选择。没有某一种特定的培养基或培养基的组合适用于所有标本。应依据标本类型和可疑真菌的种类谨慎选择培养基[1,3,7-11]。如果标本来自非无菌部位，注意所选的培养基应含有抑菌成分，如氯霉素、庆大霉素，和(或)放线菌酮(cycloheximide)。氯霉素或庆大霉素可抑制多数污染细菌，而放线菌酮抑制多数腐生霉菌。应记住：放线菌酮也会抑制某些重要的条件致病性真菌，如镰刀菌、帚霉菌、假霉样真菌、毛孢子菌、某些曲霉属、马尔尼菲篮状菌(旧称马尔内菲青霉)、毛霉菌、某些暗色真菌和酵母菌(如隐球菌属、某些念珠菌属)。因此对标本的初代接种，有必要选择含抑菌剂和不含抑菌剂的2种培养基。CLSI标准M45-A[12]对选择和使用真菌培养基有非常好的说明。

苯菌灵(benomyl)是一种杀真菌剂，可选择性抑制很多子囊菌属真菌，而不抑制担子菌和毛霉菌等其他真菌[13]。当把苯菌灵加入真菌培养基(10 μg/ml)，例如，沙氏葡萄糖琼脂(Sabouraud dextrose agar)、土豆葡萄糖琼脂(potato dextrose agar)，对苯菌灵的耐药性对区分不同霉菌有很重要的作用，尤其是那些不产生有特点的产孢结构的真菌。苯菌灵也可加入培养基来抑制环境样本中我们希望得到的霉菌生长，苯菌灵还可加入鸟食琼脂(birdseed agar)培养基，来从环境土壤样本中分离格特隐球菌[14]。

培养基可分配至容器中，如25 mm×150 mm的螺旋口试管，或直径100 mm的有盖培养皿。试管培养基(斜面/深部)安全性最高，可防止干燥与污染，但接种的表面积小。当要运输真菌菌株至参考实验室进一步鉴定时，需要使用安全性高的试管培养基。与试管培养基不同，有盖培养皿具有较大表面积供分离菌落，可稀释标本中的抑菌物，但为了在延长培养期间防止干燥，必须倾倒足够厚的液体培养基，至少需25 ml。此外，平板

*本章包含Mark D. Lindsley、James W. Snyder、Ronald M. Atlas和Mark T. LaRocco在本手册第11版第115章中呈现的部分内容

会接触空气，在培养过程中有被污染的可能。平板可放置于透气的袋内，或用透气胶带密封以弥补其缺陷。透气胶带还可保证培养基盖的安全性，防止在生物安全柜外意外打开盖子。另外一种方式是将培养基倾倒入平底烧瓶（flat-bottom flask）中，这同时兼顾了平板培养基表面积大和试管培养基安全性高的优点。瓶装培养基对培养双相真菌尤其有用。有盖培养皿或塑料烧瓶有可能裂开或破损，因此，它们不能用于转运真菌培养物至参考实验室。

接种后，培养物应置于25～30℃孵育。当样本取材自深部，例如，组织活检、支气管肺泡灌洗液、脑脊液等，应准备另一备份的培养物于35～37℃孵育，使致病性真菌能更快地生长。真菌培养报告阴性结果需要孵育4～6周，然而很多真菌培养在接种后24 h即可看到菌落生长，如很多酵母菌可在5天甚至更短时间内检出，皮肤癣菌可在1周内检出，暗色真菌和双相真菌可在2～4周检出。因此，考虑到生长速度的差异，真菌培养应按照一定的时间间隔查看是否有生长（例如第1周每日查看，第2周查看3次，第3周查看2次，第4周查看1次），而不是仅在第4周末查看1次。虽然前几周可能会看到菌落生长，转种后还需继续孵育原平板，以检测生长缓慢的致病性真菌。对培养物的操作应在经过认证的生物安全柜中进行，以防止平板被污染和人员暴露于潜在有危险的真菌环境中。

无论是商品化还是实验室自制，每批新培养基必须经过质控程序，以确保其外观、pH和性能[12,15]。质控试验的操作程序应同时包含阳性和阴性质控菌株[12,15]。用于初代分离的培养基（media for primary isolation）应检测多种致病性真菌能否最佳生长；选择性培养基（selective media）应检测对培养基中已知抑菌剂敏感和耐药的菌株；鉴别性培养基（differential media）应评估产生阳性反应和阴性反应的真菌。很多预制好的平板或试管培养基已经商品化。虽然厂家已进行了质控检测，临床实验室仍需要确认培养基符合性能标准。对某些广泛使用的商品化预制培养基，如果能获得生产商提供的质控检测证明，则可免除常规的质控检测。不可免除质控检测的培养基仍需要进行特定的质控检测。CLSI文件M22-A3和M54-A列举了这类培养基的清单[12,15]。这些要求在美国适用，在其他国家可能会有区别。美国的认可机构，如美国医疗保险和医疗补助计划服务中心的临床实验室改进法案，或美国病理学家协会，不再承认可以豁免质控检测的那些培养基。因此，认可机构在检查临床实验室时，要求必须对实验室内所有批次的培养基进行质控检测。

除非特殊说明，本章中所列试剂和培养基的制备应在指定的液体中溶解溶质，并用磁力棒搅拌。需要时应使用标准的高压灭菌技术（sterilization technique of autoclaving）[121℃，15磅/英尺^2（1磅＝0.45kg，1英尺＝0.3m），灭菌15 min]。然而，某些溶液（如含抗生素或糖类时）会高温变性，因此不能高压灭菌。这些溶液可先经0.22 μm孔隙滤器过滤除菌，然后加入灭菌后充分冷却的培养基中。念珠菌显色琼脂（*Candida* chromogenic agar）可在微波炉中加热。

已配制好的试剂应储存在无菌、密封、螺旋口的容器中。某些试剂需要避光保存，而某些试剂则需要冷藏（2～8℃）而非室温保存。需要特殊保存时会给予说明。配制试剂时要有标准的安全防护措施。除了要遵守实验室的安全规程外，还要遵守所用化学品的安全指南。

本章涵盖了已普遍使用的和一些特殊的染色剂、培养基和试剂。此外，组织病理学在诊断真菌感染中也非常有用[16]。以下列举的很多染色剂[Fontana-Masson染色、六胺银染色（methenamine silver stain）、黏蛋白卡红染色（mucicarmine stain）、过碘酸雪夫染色（periodic acid-Schiff stain）]也适用于真菌感染的组织病理学诊断[17]。这里没有包括的更多具体信息，请参考本章引用的文献。

一、试剂

（一）N-乙酰-L-半胱氨酸（0.5%）

N-乙酰-L-半胱氨酸（N-Acetyl-L-cysteine，NALC）（Alpha Tec Systems，Inc.）是用于消化痰标本的黏液溶解剂，此类标本主要用于显微镜检测耶氏肺孢子菌包囊和（或）滋养体。NALC也可用于制备针对很多种真菌镜检所用的标本。混合物中含枸橼酸钠（0.1 M），以发挥稳定NALC的作用。含氢氧化钠（NaOH）的配方对真菌生长有抑制作用，应避免使用。

(二)二硫苏糖醇(0.0065M)

二硫苏糖醇(Dithiothreitol,Sputoly-sin)是一种可购买到的商品化黏液溶解剂,主要用于制备痰标本检测耶氏肺孢子菌。痰与二硫苏糖醇等体积混合,然后35℃孵育。将混合物间断地剧烈摇晃,直至接近液化(完全液化会使耶氏肺孢子菌分散,使显微镜检查变得困难)。与NALC类似,二硫苏糖醇可用于制备真菌显微镜检查的标本,适用范围很广。含NaOH的配方对真菌生长有抑制作用,应避免使用。

(三)氢氧化钾

用10%氢氧化钾(potassium hydroxide,KOH)制备的湿片用于区分厚黏液状标本内的真菌和角质蛋白成分(如皮肤、毛发、甲)。甲标本在显微镜检查之前,需要更强的碱处理(高达25%)来消化(第126章)。宿主细胞的蛋白质成分被部分消化,留下完整且更加明显的真菌细胞壁。取少量标本加入一滴10%或20%的KOH,可添加0.1%的硫柳汞(Sigma Chemical Co.)保存。加入KOH后,玻片在室温放置5~30 min,时间长短取决于标本种类,目的是使其消化。轻微加热或添加40%二甲基亚砜可提高消化的能力[18]。对真菌感染的毛发、皮肤、甲进行显微镜直接检查时,NaOH溶液(10%或25%,添加甘油)可代替KOH溶液使用。可通过加入乳酚棉蓝或葡聚糖结合荧光增白剂,如荧光增白剂钙荧光白(Calcofluor white),来增强真菌成分的观察效果。荧光增白剂可结合几丁质,它是一种真菌细胞壁的主要成分,将在后文讨论。

二、染色剂

(一)阿尔辛蓝染色

阿尔辛蓝(Alcian blue)和更常用的黏蛋白卡红染色(mucicarmine stain)(见下文)均为黏多糖染色剂,其有助于观察组织病理标本中隐球菌属产生的荚膜多糖。

基本操作步骤 脱蜡后切片用阿尔辛蓝(1 g阿尔辛蓝溶于100 ml乙酸,配成3%的溶液)染色30 min,流动自来水冲洗,再用蒸馏水冲洗。核固红(0.1 g核固红溶于100 ml硫酸铝,配成5%溶液)复染。用95%乙醇和无水乙醇脱水处理后,使用二甲苯清洗,最后Permount(Fisher Scientific)封片。荚膜多糖染为蓝色,背景染为粉色。

(二)子囊孢子染色

子囊菌类真菌生长于促产孢培养基时,可产生子囊孢子。可通过孔雀石绿和番红组成的差异染色法观察子囊孢子。子囊孢子染成绿色,真菌的营养体染成红色。子囊孢子具有抗酸性,因此Kinyoun抗酸染色(第31章)也可用于观察此结构。

基本操作步骤 在玻片上涂一薄层生长物,加热固定。玻片用孔雀石绿(5 g溶于100 ml蒸馏水)浸泡3 min,自来水冲洗,再用95%乙醇脱色30 s,番红染液(5%)复染30 s。玻片用自来水冲洗后在空气中干燥,用×400倍和×1000倍显微镜观察。

(三)钙荧光白

钙荧光白及其相关化合物,如Uvitex 2B和Blankophor,为非特异性、非免疫原性的荧光染料,可结合β-1,3和β-1,4多糖,即真菌细胞壁特异性的纤维素和几丁质。与金胺-罗丹明染色剂类似,钙荧光白的染色速度快,因此,在微生物实验室普遍应用。荧光染料可与KOH混合,使标本更加清晰,易于观察真菌结构。当使用紫外光或蓝紫色光作为激发光时,真菌结构显示为青白色,背景为黑色。用紫外光激发时会产生最佳的荧光。应使用510、520或530的吸收滤光片,以保护眼睛。微生物会发出蓝白色至绿色的荧光[20],具体颜色取决于所用激发光源和吸收滤光片的组合。典型的耶氏肺孢子菌包囊直径通常为5~8 μm,圆形,大小一致,表现为特征性的外周包囊壁染色,具有浓染的"双括号样"(double parenthesis-like)结构[19-20]。可通过出芽和浓染特点来区分酵母菌和耶氏肺孢子菌。对钙荧光白染色结果的解释需谨慎,可能会观察到非特异性反应。棉纤维可发出强烈荧光,需与真菌菌丝相区别。另外,组织标本(例如,来自肿瘤患者的脑活检标本)也可发出类似曲霉或其他具有分枝菌丝霉菌的荧光。

基本操作步骤 钙荧光白可从多家真菌培养基和化学品供应商购买,可以是预混合的或者粉末状的(见本章最后的供应商目录)。10%的

KOH与钙荧光白溶液(0.10 g钙荧光白M2R和0.05 g伊文蓝溶于100 ml水)等比例混合后,覆盖标本,再盖上盖玻片。在观察前应静置玻片5~10 min,以使组织澄清,并使染料与真菌成分相互作用。某些甲或组织标本的制备可能需要更长的孵育时间(长达30 min)以使标本澄清。也可在玻片加热器上轻微加热玻片以加速澄清过程。为得到最佳结果,组织澄清后应尽快观察。使用合适激发光和吸收滤光片的荧光显微镜(×100倍和×400倍放大)观察制备的玻片。产暗色素真菌的色素会掩盖荧光,用钙荧光白染色效果不佳。

(四)胶态碳湿片[印度墨汁(India ink)、苯胺黑(nigrosin)]

胶态碳湿片用于观察包裹在荚膜内的微生物,尤其是隐球菌属。微生物的多糖荚膜可抵抗墨汁颗粒,形成环绕微生物的透明光环。某些干扰物,如红细胞、白细胞、手套的滑石颗粒、脊髓穿刺术取脑脊液制片后的气泡等可替代胶态悬浮物,被误认为酵母(假阳性)。应当仔细观察湿片排除上述干扰,并应注意微生物的特性(例如,有圆形、大小不等的出芽,双轮廓的细胞壁)。胶态混悬的乳浊液过厚会阻碍光线传播,不利于结果解释。

基本操作步骤 将患者脑脊液与商品化印度墨汁或苯胺黑在玻片上等体积混合,盖上盖玻片,在×100倍和×1000倍显微镜下观察。应注意防止大包装的印度墨汁出现污染。小体积或个人用的分液器能从很多培养基和试剂经销商处购买到。

(五)铵银(Fontana-Masson)染色

铵银(Fontana-Masson)染液最初用于观察哺乳动物组织中的黑色素颗粒,在真菌学上主要用于观察暗色(含黑色素)真菌,少数情况下也可检测组织标本中的新型隐球菌(*Cryptococcus neoformans*)/格特隐球菌(*Cryptococcus gattii*)。真菌成分显示褐色至黑褐色,而背景为红色。

基本操作步骤 铵银溶液制备时,需将浓缩的氢氧化铵加入10%硝酸银直至沉淀物消失。将脱蜡后组织标本脱水处理,置于加热银溶液30~60 min。玻片用去离子水冲洗,氯化金(0.2 g溶于100 ml蒸馏水)染色10 min,5%硫代硫酸钠固定5 min。标本使用浓度不断增加的乙醇脱水处理,二甲苯清洗,封上盖玻片。

(六)吉姆萨染色

吉姆萨染色(Giemsa stain)用于检测骨髓和白膜层样本的荚膜组织胞浆菌的胞内酵母形态。常可见巨噬细胞内小卵圆形酵母细胞,染为蓝色,透明晕代表染色不佳的细胞壁。该染色也可用于观察耶氏肺孢子菌(*Pneumocystis jirovecii*)的滋养体。

基本操作步骤 在玻片上制备薄层涂片,置于100%甲醇1 min。倒掉玻片上的液体,加新鲜制备的吉姆萨染液(将储存液用磷酸盐缓冲液以1:10稀释)。5 min后玻片用蒸馏水冲洗,晾干。用×100倍至×400倍显微镜观察。

(七)Lacto-fuchsin

Lacto-fuchsin是一种封固液,可代替广泛使用的乳酚棉蓝(见下文)。它染色真菌结构更快,Lacto-fuchsin封固液的折光率很高,真菌结构更易观察[21]。真菌结构染成粉红色至红色。Lacto-fuchsin染色需要更长的干燥时间。为了防止移动而破坏镜下霉菌的结构,盖玻片周围应使用指甲油密封。

基本操作步骤 溶解0.1 g Lacto-fuchsin于100 ml乳酸(85%),配制成Lacto-fuchsin溶液。如果要封藏更久,可在溶液中加入聚乙烯醇。商品化的预制溶液可通过本章结尾列举的公司购买到。

(八)乳酚棉蓝

乳酚棉蓝(lactophenol cotton blue,LPCB)是一种基本的真菌封固剂,由酚、乳酸、甘油、苯胺(棉)蓝染料组成。溶液可过滤去除染料沉渣,然后室温储存。真菌培养物经挑取或胶带粘贴制备后,常用LPCB进行显微镜检查。加入10%聚乙烯乙醇(LPCB-PVA)可对封固于玻片的培养物起到长期染色和固定的作用[3]。

基本操作步骤 将浓缩酚[20%(体积/体积)]加入甘油(40%)、乳酸(20%)和水(20%)的混合液,然后加入苯胺蓝(0.05 g)。溶液可通过过滤除菌去除染料沉渣。加一滴至玻片,经挑取或胶带粘贴真菌成分制备玻片。盖上盖玻片,用×100倍至×400倍显微镜观察。

(九)乳酚棉蓝和氢氧化钾(10%)

在LPCB封固的湿片中加入KOH,与直接KOH制片具有同样的目的(见前所述)。然而,LPCB增加了在KOH溶液中真菌的观察效果。这是因为胺蓝染色真菌细胞壁,乳酸作为额外的清洁剂。LPCB中的酚是作为杀真菌剂。

(十)六胺银染色

六胺银染色(methenamine silver stain)可能是观察组织内真菌最实用的染色方法。真菌成分被染成黑色,而背景为淡绿色或黄色。此方法为特殊染色法,在组织学实验室比在微生物学实验室更常使用。Grocott改良的Gomori六胺银染色(GMS)常用于脱蜡组织内真菌的组织病理学检查。进一步苏木素和伊红(HE)复染可显示宿主组织反应和银染的真菌结构。

基本操作步骤 加3%六亚甲基四胺(3 g溶于100 ml蒸馏水)至5%硝酸银(5 g溶于100 ml蒸馏水),直至产生白色沉淀,摇晃后又变澄清,即为制备的六胺银储存液。然后将此溶液用蒸馏水以1∶2比例稀释,再加入5 ml 5%照相级硼砂。制备的玻片在铬酸溶液(5 g溶于100 ml蒸馏水)中氧化,再用亚硫酸钠(1 g溶于100 ml蒸馏水)中和,置于稀释的六胺银溶液,微波炉中加热至58～60℃,直至变为黄褐色。用蒸馏水剧烈冲洗玻片,再用氯化金(0.1 g溶于100 ml蒸馏水)染色。将玻片放置于硫代硫酸钠溶液(2 g溶于100 ml蒸馏水),去除未还原的银,然后用0.03%品绿复染。冲洗,待印迹干燥,用×100倍至×400倍显微镜观察。

(十一)黏蛋白卡红染色

黏蛋白卡红染色(mucicarmine stain)对于区分在组织标本中发现的新型隐球菌(*C. neoformans*)和格特隐球菌(*C. gattii*)与其他具有类似大小和形状的真菌具有重要作用。真菌荚膜物质中的黏多糖被染成深玫瑰色至红色,而其他组织成分染为黄色。皮炎芽生菌(*Blastomyces dermatitidis*)和西伯鼻孢子菌(*Rhinosporidium seeberi*)经此染色下也呈阳性,可通过酵母细胞大小和隐球菌黏多糖荚膜的染色反应强度来区分。

基本操作步骤 在玻片上固定的组织标本先用Weigert铁苏木素染色,置于黏蛋白卡红溶液(1 g卡红和0.5 g无水三氯化铝溶于2 ml蒸馏水,然后在100 ml 50%乙醇中稀释)30～60 min。玻片用蒸馏水冲洗,然后用间胺黄复染(0.25 g溶于100 ml蒸馏水)。冲洗,印迹干燥,最后用×100倍至×400倍显微镜观察。

(十二)过碘酸雪夫染色

过碘酸雪夫(periodic acid-Schiff,PAS)染色用于检测临床标本中的真菌,尤其是组织内酵母细胞和菌丝。

真菌染为亮粉红色或紫色,使用苦味酸复染时背景为橙色,品绿复染时背景为绿色。染色方法为多步骤法,包括溶解和染色。过碘酸经溶解细胞壁中的醛后,可结合改良的雪夫试剂,使细胞壁的糖类染为明粉红色。临床标本中的多数真菌均可以着色,因此PAS染色是很好的常规染色法。然而PAS染色程序非常复杂,需要多种不同的试剂和耗时的步骤,因此在很多实验室已被钙荧光白染色所取代。由于黏蛋白也可染成明亮的粉红色,PAS染色不能用于未经消化的呼吸道分泌物。

基本操作步骤 制备的玻片用福尔马林-乙醇固定1 min,然后在空气中晾干。将玻片浸入5%过碘酸5 min,再浸入碱性品红(0.1 g染料溶于5 ml 95%乙醇和95 ml水)2 min。用水冲洗,浸入亚硫酸锌或亚硫酸钠溶液(1 g亚硫酸锌或亚硫酸钠和0.5 g酒石酸溶于100 ml水)10 min。用水冲洗,再用饱和的水化苦味酸复染2 min或用品绿(1 g染料和0.25 ml乙酸溶于100 ml 80%乙醇)复染5 s。冲洗,待印迹干燥,用×100倍至×400倍显微镜观察。

(十三)甲苯胺蓝O

甲苯胺蓝O(toluidine blue O)主要用于肺活检样本和支气管肺泡灌洗液(BAL)标本的压片观察耶氏肺孢子菌(*P. jirovecii*)[22]。耶氏肺孢子菌的包囊被甲苯胺蓝O染成品蓝色或深紫色,背景染成浅蓝色。包囊常成群分布,并可能有孔洞,看似新月形。此方法不能观察到滋养体。虽然可以采用银染、单克隆抗体、钙荧光白染色等方法,但甲苯胺蓝O染色简单、快速,对合适的标本(例如BAL标本)能得到可靠的结果。

基本操作步骤 玻片在空气中晾干,置于硫酸盐化试剂(45 ml冰乙酸与15 ml浓缩硫酸混合)

10 min。冷水冲洗 5 min，吸干，加入甲苯胺蓝 O（0.3 g 染料溶于 60 ml 水）染色 3 min。依次用 95%乙醇、无水乙醇、二甲苯冲洗。用×100 倍至×1000 倍显微镜观察。

三、培养基

（一）琼脂玻片培养基

玻片培养法（slide culture method）可在显微镜下观察到最佳真菌菌落形态，将一块约 15 mm×15 mm 的培养基置于无菌显微镜玻片上。拟观察的真菌接种于培养基块的各个边缘，并盖上 22 mm×22 mm 的盖玻片，在独立的湿盒中孵育。当产生充足的孢子时，移除盖玻片并将有菌生长的一侧向下，置于含 1 滴乳酚棉蓝或其他合适封片液的显微镜玻片上。用×200 倍和×400 倍显微镜观察真菌形态。已有商品化的预制玻片培养基。所用的琼脂和培养温度应根据诱导真菌产孢所用的最佳条件来确定。从 Remel（Slide Culture Plate）和 Hardy Diagnostics（Mycovue）能找到这种商品化的琼脂，在本章最后有列举。

（二）醋酸子囊孢子琼脂

醋酸子囊孢子琼脂（acetate ascospore agar）用于培养产子囊孢子的酵母菌，例如，酿酒酵母（*Saccharomyces cerevisiae*）。已证实含醋酸钾的配方比既往所用的含醋酸钠配方更能促进产孢。在这种培养基上产生的子囊孢子经 Kinyoun 石炭酸品红抗酸染色后，可在显微镜下观察。

（三）抗真菌药物敏感性试验培养基

在抗真菌药物敏感性试验方法的最新进展中，确定了目前针对此类试验所适用的几种培养基。关于这个话题全面的论述，见本书第 134 章。

（四）鸟食琼脂

鸟食琼脂（birdseed agar）是用于分离隐球菌属（尤其是新型隐球菌和格特隐球菌）的选择性和鉴别性培养基，这种菌的独特之处在于能够产生酚氧化酶。鸟食（小葵子或黑芝麻）中的底物被降解后产生黑色素，吸收入真菌细胞壁后，菌落会产生棕褐色至褐色的色素。其他真菌的菌落为米黄色或奶油色。氯霉素作为一种筛选剂可抑制细菌和某些真菌生长。肌酐能增强新型隐球菌部分菌株的黑素化作用。

（五）亚硫酸铋-葡萄糖-甘氨酸酵母琼脂

亚硫酸铋-葡萄糖-甘氨酸酵母琼脂（bismuth sulfite-glucose-glycine yeast agar，BiGGY agar）是用于分离和鉴别念珠菌属的选择性和鉴别性培养基。蛋白胨、葡萄糖和酵母提取物是基础营养成分。念珠菌属还原亚硫酸铋为硫化铋，可使酵母菌菌落出现色素沉着。某些菌种的菌落周围培养基也会有色素沉着。白念珠菌为褐色至黑色的菌落，无色素扩散，无光泽；热带念珠菌产生深褐色的菌落，中心黑色，黑色素可扩散至培养基，有光泽。用这种培养基也可观察到不同念珠菌属的特定菌落形态和生长模式。亚硫酸铋也是细菌生长的抑制剂，使培养基具有选择性。

（六）血液-葡萄糖-半胱氨酸琼脂

温度依赖性双相病原真菌在 37℃培养下可从菌丝相转变为酵母相，以此可进行菌种鉴定。血液-葡萄糖-半胱氨酸琼脂（blood-glucose-cysteine agar）平板能促进荚膜组织胞浆菌（*Histoplasma capsulatum*）、皮炎芽生菌（*Blastomyces dermatitidis*）、巴西副球孢子菌（*Paracoccidioides brasiliensis*）、申克孢子丝菌（*Sporothrix schenckii*）的菌丝相-酵母相转换。培养基含基础的胰蛋白血琼脂、L-半胱氨酸和脱纤维羊血，并添加了青霉素以防止细菌污染。

（七）脑心浸液琼脂（真菌配方）

含羊血的脑心浸液（brain heart infusion，BHI）琼脂是培养和分离包括苛养双相真菌在内所有真菌的培养基。基础营养成分是 BHI 琼脂，并加入 10%羊血增加营养。加入抗生素（氯霉素和庆大霉素）抑制细菌生长，使培养基具有选择性。该培养基不抑制腐生真菌。当试图分离更苛养的霉菌时，应包含一个含放线菌酮的培养基，以抑制腐生霉菌的过度生长。

（八）溴甲酚紫-固态乳-葡萄糖培养基

溴甲酚紫-固态乳-葡萄糖（bromcresol purple milk solids glucose）（Dermatophyte Milk Agar，

Hardy Diagnostics)是用于鉴定毛癣菌属的鉴别性培养基(differential medium)。培养基的鉴别能力依赖于生长模式(与标准营养培养基相比,是扩散生长还是限制性生长)和产生碱性副产物引起的 pH 指示剂变化。

(九)咖啡琼脂

咖啡琼脂(caffeic agar)正如之前所讨论,是由鸟食琼脂改进而来。咖啡酸是黑芝麻中有生物学活性的化学物质,可使新型隐球菌(*C. neoformans*)的酵母样菌落变为褐色[23]。

(十)刀豆氨酸-甘氨酸-溴麝香草酚蓝琼脂

刀豆氨酸-甘氨酸-溴麝香草酚蓝琼脂(canavanine-glycine-bromthymol blue agar)是区分新型隐球菌(*C. neoformans*)和格特隐球菌(*C. gattii*)的鉴别性培养基。培养基含甘氨酸、硫胺素、L-刀豆氨酸硫酸盐和溴麝香草酚蓝。将隐球菌的菌落在琼脂表面划线,30℃孵育1～5天。格特隐球菌(血清型B和C)使培养基变为钴蓝色,而新型隐球菌grubii变种(血清型A)和新型隐球菌新型变种(血清型D)使培养基变为黄绿色。

(十一)念珠菌显色培养基

显色培养基(chromogenic media)使酵母菌的直接、快速鉴定变得更加便利,特别适用于检测和分离混合培养物。该培养基含显色底物,可被种属特异性的酶类(如β-N-乙酰己糖胺酶)水解,根据不同培养基,可再加入第二种酶即β-葡萄糖苷酶或磷酸酶。根据菌落特征和颜色变化将酵母菌鉴定至菌种水平[24-26]。已商品化的显色培养基总结在表118-1中。

美国FDA批准了美国实验室使用的一些显色培养基产品。产品的简要介绍包括不同酵母菌与显色物质如何相互作用,及其产生的特征性菌落颜色变化。

表 118-1 商品化来源的酵母菌显色琼脂培养基

培养基	制造商	可鉴定的念珠菌种属[a]
念珠菌诊断性琼脂(CDA)	PPR Diagnostics,Ltd	白念珠菌、乳酒念珠菌、热带念珠菌
念珠菌显色琼脂	Laboratorios CONDA	白念珠菌、热带念珠菌、克柔念珠菌
CandiSelect 4	Bio-Rad Laboratories	白念珠菌
		初步鉴定:光滑念珠菌、热带念珠菌、克柔念珠菌
念珠菌柯玛嘉	CHROMagar Microbiology	白念珠菌、热带念珠菌、克柔念珠菌
BBL 柯玛嘉	BD Diagnostic Systems	白念珠菌、热带念珠菌、克柔念珠菌
ChromID 念珠菌琼脂	bioMerieux,Inc.	白念珠菌
		初步鉴定:热带念珠菌、葡萄牙念珠菌、乳酒念珠菌
HardyCHROM Candida	Hardy Diagnostics	白念珠菌、热带念珠菌、克柔念珠菌
		初步鉴定:光滑念珠菌
HiCrome 念珠菌差异琼脂	HiMedia Laboratories	白念珠菌、克柔念珠菌、热带念珠菌、光滑念珠菌
Oxoid Brilliance 念珠菌琼脂	Oxoid	白念珠菌、克柔念珠菌、热带念珠菌
		初步鉴定:光滑念珠菌、乳酒念珠菌、近平滑念珠菌、葡萄牙念珠菌

注:[a] 由制造商提供的念珠菌种属鉴定。初步推测判定的种属需要进一步试验得到最终鉴定

(十二)柯玛嘉

柯玛嘉(CHROMagar)是用于分离和鉴别临床重要酵母菌的鉴别性和选择性培养基。基础营养成分为蛋白胨和葡萄糖。氯霉素通过抑制细菌生长使培养基具有选择性。可选择含和不含氟康唑的培养基,前者可进一步筛选氟康唑耐药的念珠菌(如克柔念珠菌)。特有的显色混合物可区分多种酵母菌,如白念珠菌会形成黄绿色或蓝绿色菌落。已经证实,通过菌落形态和独特的颜色类型对酵母菌进行初步鉴定是非常可靠的[24,26]。有证据表明,柯玛嘉比沙氏琼脂更具选择性,有助于鉴定多种酵母菌的混合培养物,并有助于提高光滑念珠菌对海藻糖的快速同化作用[26]。应在48 h评估培养基上的菌落。虽然新型隐球菌和地霉菌(*Geotrichum* species)能在此

培养基上生长，但最终仍需转种至非选择性培养基，随后通过合适的生化试验和形态学特征进行鉴定。

(十三)ChromID 念珠菌琼脂(ChromID candida agar,CAN2)

白念珠菌在特定酶作为诱导剂下，通过水解己糖胺酶显色底物，菌落可变为蓝色(生物梅里埃专利)。水解第二底物(粉色)可区分混合的培养物，并提示需要鉴定其他念珠菌属(生物梅里埃专利)。

(十四)Christensen 尿素琼脂

水解尿素的能力是初步鉴定隐球菌(*Cryptococcus*)、毛孢子菌(*Trichosporon*)和红酵母属(*Rhodotorula* spp.)的重要表型特征。尿素水解试验也可用于鉴定某些皮肤癣菌，尤其是须癣毛癣菌(*Trichophyton mentagrophytes*)和红色毛癣菌(*Trichophyton rubrum*)。该培养基含 2% 尿素，用酚红作为指示剂。

(十五)含 1% 葡萄糖的的玉米琼脂

含 1% 葡萄糖的玉米琼脂(Cornmeal agar with 1% dextrose)用于培养真菌，并能依据产色素不同鉴别须癣毛癣菌(*T. mentagrophytes*)和红色毛癣菌(*T. rubrum*)。用吐温 80(聚山梨醇酯 80)代替葡萄糖能提高红色毛癣菌的生长及红色色素的产生。

(十六)含吐温 80 的玉米琼脂

含吐温(聚山梨醇酯)80 的玉米琼脂(Cornmeal agar with Tween 80)根据不同菌株间的形态学特征，可用于培养和鉴别念珠菌属。吐温 80 是一种表面活性剂，可特异性地结合葡萄糖，促进产生假菌丝、厚垣孢子和关节孢子。如果将酵母接种物置于盖玻片下方或接种于培养基内，可产生微需氧环境，最有利于产生厚垣孢子。酵母生长的基本营养素来自玉米浸液。

(十七)察氏琼脂

察氏琼脂(Czapek-Dox agar)培养基用于曲霉菌属的鉴别[1-2,27]。蔗糖是唯一碳源，硝酸钠是唯一氮源。任何可利用硝酸钠作为氮源的细菌或真菌均能在此培养基上生长。

(十八)皮肤癣菌试验培养基

皮肤癣菌试验培养基(dermatophyte test medium,DTM)是用于从角质标本(毛发、皮肤、甲)中回收、选择和鉴别皮肤癣菌(小孢子菌属、毛癣菌属、表皮癣菌属)的筛查培养基。大豆蛋白胨提供氮源和碳源。放线菌酮抑制腐生霉菌，氯霉素抑制多种革兰阳性细菌，庆大霉素抑制革兰阴性细菌。通过这种培养基很容易观察到形态学和显微镜下特征。但由于酚红指示剂的存在，不能辨别色素。当有皮肤癣菌生长时，培养基由黄色变为红色。曲霉菌属和其他腐生真菌也能在此培养基生长并产生色素，因此建议仅作为筛查培养基使用。

(十九)抑制性霉菌琼脂

抑制性霉菌琼脂(inhibitory mould agar)是选择性和增菌型培养基，用于污染标本中培养放线菌酮敏感真菌的常规培养，如隐球菌(*Cryptococcus* species)、毛霉菌(*Mucoraceous* fungi)和荚膜组织胞浆菌(*H. capsulatum*)。酪蛋白和动物组织提供营养成分。酵母提取物作为维生素的来源。氯霉素抑制多种革兰阳性和革兰阴性细菌，庆大霉素是另一种添加剂，抑制某些革兰阴性细菌。该培养基适用于初代真菌培养，已证实其敏感性高于标准的沙氏葡萄糖琼脂[28]。

(二十)Lactritmel 琼脂(Borelli 培养基)

Lactritmel 琼脂(Lactritmel agar, Borelli's medium)由全麦粉、脱脂牛奶和蜂蜜组成，适合于大多数皮肤癣菌产孢和毛癣菌属产色素。培养基也可用于暗色真菌的形态学检查。

(二十一)利明和诺特曼培养基

利明和诺特曼培养基(Leeming and Notman medium)用于分离、培养依赖脂类生长的马拉色菌属。培养基的主要组分包括牛胆汁、单硬脂肪酸甘油酯、甘油、吐温 80、牛乳(全脂)[29]。此培养基可作为沙氏葡萄糖琼脂的替代选择，因为不是所有真菌都能在此培养基上生长，例如，球形马拉色菌(*M. globosa*)、限制马拉色菌(*M. restricta*)、钝形马拉色菌(*M. obtusa*)的分离需要更复杂的培养基。

(二十二)利特曼牛胆汁琼脂

利特曼牛胆汁琼脂(Littman oxgall agar)是用于从污染标本中分离真菌的常规选择性培养基。结晶紫和链霉素抑制细菌生长，为筛选剂。牛胆汁限制真菌菌落的扩散。该培养基的分离特征与含氯霉素的沙氏葡萄糖琼脂及抑制性霉菌琼脂类似，允许对放线菌酮敏感的真菌生长。

(二十三)麦芽提取物(Malt extract)(2%)琼脂

此培养基用于培养酵母菌和霉菌。目前已有多种配方，通常在琼脂中含麦芽提取物(Malt extract)，并补充蛋白胨、葡萄糖、麦芽糖、糊精和(或)甘油。麦芽琼脂对刺激犬小孢子菌(*Microsporum canis*)产生大分生孢子尤其有用。

(二十四)Mycobiotic 或 Mycosel 琼脂

Mycobiotic(Remel)和 Mycosel(BD Diagnostic Systems)是选择性培养基的商品名，主要用于分离皮肤癣菌，也用于从腐生霉菌和细菌的污染标本中分离其他致病性真菌。培养基主要由经胰酶水解后的大豆粉和葡萄糖来源的蛋白胨组成。筛选剂是放线菌酮和氯霉素。放线菌酮抑制快生长的腐生霉菌，但也抑制一些有临床意义的真菌，包括某些念珠菌和曲霉菌、毛霉菌和新型隐球菌。氯霉素抑制革兰阴性和革兰阳性细菌。

(二十五)黑芝麻琼脂(Niger seed agar)

见鸟食琼脂。

(二十六)马铃薯葡萄糖琼脂

马铃薯葡萄糖琼脂(Potato dextrose agar)是用于刺激真菌产生分生孢子的培养基，也可刺激某些皮肤癣菌产生色素。这种培养基最常用于玻片培养技术，来观察形态学特征。马铃薯浸液和葡萄糖对真菌生长提供了很好的营养因子。培养基中加入了酒石酸降低 pH，可抑制细菌生长。

(二十七)马铃薯薄片琼脂

马铃薯薄片琼脂(potato flake agar)用于刺激真菌产生分生孢子。与马铃薯葡萄糖琼脂相比，其优势在于制备简单和稳定性较好。马铃薯片和葡萄糖提供生长所需营养。pH 通常调为 5.6 以促进真菌生长并抑制细菌生长。培养基加入放线菌酮和氯霉素使其具有选择性。

(二十八)沙氏脑心浸液

沙氏脑心浸液(Sabouraud brain heart infusion，SABHI)琼脂是常规目的的培养基，用于分离和培养所有真菌，是脑心浸液琼脂和沙氏葡萄糖琼脂的组合。这种组合的配方使包括双相真菌酵母相在内的多数真菌都能被检出。加入羊血可为更多的苛养真菌提供必需的生长因子，并能促进荚膜组织胞浆菌(*H. capsulatum*)的生长。通过加入氯霉素、放线菌酮、青霉素和(或)链霉素来使其具有选择性。

(二十九)沙氏葡萄糖琼脂

沙氏葡萄糖琼脂(Sabouraud dextrose agar)是由 Sabouraud 发明的配方，用于培养皮肤癣菌。它由经胰酶消化的酪蛋白、经胃液消化的动物组织和4%浓度的葡萄糖组成，经缓冲液调节 pH 至 5.6。Emmons 改良了最初配方，将葡萄糖浓度减至 2%，并调节 pH 至接近中性(6.9～7.0)。在不同组合中添加的抗生素包括放线菌酮、氯霉素、庆大霉素、环丙沙星、青霉素和(或)链霉素，可抑制某些真菌、革兰阳性和革兰阴性细菌，以使该培养基具有选择性。该培养基也有肉汤形式可供选择。

(三十)土壤提取物琼脂

土壤提取物琼脂(soil extract agar)是由园地的土壤、酵母提取物和葡萄糖组成的培养基。这种培养基的主要用途是增加某些腐生霉菌产孢，以及皮炎芽生菌(*B. dermatitidis*)菌株间的交配[2]。

(三十一)毛癣菌琼脂 1-7

毛癣菌琼脂(*Trichophyton* agars)是由 7 种不同培养基组成的根据对生长因子的需求鉴定毛癣菌种的一套培养基组合。培养基的基本成分如下。在所有 7 种培养基的生长情况将按照 1～4 四个等级打分，从而得到鉴定结果。

1. 酪蛋白氨基酸(酪蛋白的水解物)，无维生素。
2. 酪蛋白氨基酸(酪蛋白的水解物)，肌醇。

3. 酪蛋白氨基酸(酪蛋白的水解物),肌醇,硫胺素。

4. 酪蛋白氨基酸(酪蛋白的水解物),硫胺素。

5. 酪蛋白氨基酸(酪蛋白的水解物),烟酸。

6. 硝酸铵。

7. 硝酸铵,组氨酸。

(三十二)V8琼脂

V8琼脂(V8 agar)是由脱水马铃薯薄片和V-8液(Campbell Soup Co.; Camden,NJ)组成的培养基,可诱导某些环境中的真菌早期产孢。天然的低pH值使培养基可抑制大多数细菌。

(三十三)水(自来水)琼脂[Water(tap)agar]

此培养基缺乏营养(1%水-琼脂;1 g琼脂粉溶于100 ml无菌自来水),可促进暗色真菌、雅致鳞质霉(*Apophysomyces elegans*)和管状壶霉(*Saksenaea vasiformis*)产孢[30]。可通过在此培养基中添加经灭菌处理的康乃馨叶子来鉴定镰刀菌属[8]。

(三十四)酵母碳琼脂

酵母碳琼脂(yeast carbon agar)是一种固体培养基,可依据不同酵母菌对含氮化合物同化作用的能力不同进行菌种分类。酵母碳源基质(yeast's carbon base)提供了生长必需的氨基酸、维生素、微量元素和盐。通过添加不同氮源(例如硝酸钾)来检测同化氮源的能力。虽然对酵母菌鉴定有了更新、更简单的商品化方法和分子方法,但这种传统的方法仍然会被用到。

(三十五)含氨的酵母提取物-磷酸盐琼脂(Smith培养基)

含氨的酵母提取物-磷酸盐琼脂(yeast extract phosphate agar with ammonia,Smith's medium)用于从污染标本中分离荚膜组织胞浆菌(*H. capsulatum*)和皮炎芽生菌(*B. dermatitidis*),并使其产孢。它由磷酸缓冲液(Na_2HPO_4、KH_2PO_4 和蒸馏水)组成,并与酵母提取物溶液充分混匀,用1N盐酸或1N氢氧化钠将pH调节至6.0。接种标本前,在琼脂表面加一滴氢氧化铵,使其渗透入培养基。氢氧化铵和氯霉素的组合可抑制细菌、多种霉菌和酵母菌的生长,因此可检出缓慢生长的双相真菌。

附录

商品化的真菌培养基、染色剂和试剂的生产商和供应商

Alpha Tec Systems,Inc.
P. O. Box 5435
Vancouver,WA 98668
800-221-6058
http://www.alphatecsystems.com

BD Diagnostic Systems
7 Loveton Circle
Sparks,MD 21152
800-675-0908
http://www.bd.com

bioMérieux,Inc.
100 Rodolphe St.
Durham,NC 27712
800-682-2666
http://www.biomerieux-diagnostics.com/

Bio-Rad Laboratories
5500 East Second St.
Benicia,CA 94510
800-224-6723
http://www.bio-rad.com/

CHROMagar
4 Place du 18 Juin 1940
75006 Paris
France
Tel:+33 1 45 48 05 05
Fax:+33 1 45 48 05 06
chromagar@chromagar.com
http://chromagar.com/

Fisher Scientific
2000 Park Lane Dr.
Pittsburgh,PA 15275
800-766-7000
http://www.fishersci.com

Fluka Chemika/Biochemika
Industriestrasse 25
9471 Buchs
Switzerland
41(0)81 755 25 11
webmaster@sial. com
https://www. lab-honeywell. com

Hardy Diagnostics
1430 West McCoy Lane
Santa Maria, CA 93455
800-266-2222
http://www. hardydiagnostics. com

HiMedia Laboratories Pvt. Ltd.
23 Vadhani Est. LBS Marg
Mumbai 400 086
India
91 22 40951919
info@himedialabs. com
http://www. himedialabs. com

Laboratorios Conda
c/La Forja, 9
28850 Torrejon de Ardoz, Madrid
Spain
Phone: +34 91 761 02 00
Fax: +34 91 656 82 28
http://www. condalab. com

Newcomer Supply Inc.
2505 Parview Road
Middleton, WI 53562-2579
Phone: 800-383-7799
Fax: 608-831-0866
http://newcomersupply. com

Oxoid Limited
Wade Road
Basingstoke, Hampshire RG24 8PW
United Kingdom
44(0)1256 841144
Fax: 44(0)1256 814626
www. oxoid. com/uk/blue

Helier Scientific Limited
SWT Institute for Renal Research
Wrythe Lane
Carshalton
London
SM5 1AA
United Kingdom
Telephone: +44(0)208 296 3111
http://www. helierscientific. com

Remel
12076 Santa Fe Dr.
Lenexa, KS 66215
800-255-6730
http://www. remel. com/

Scientific Device Laboratory
411 Jarvis Ave.
Des Plaines, IL 60018
847-803-9495
http://www. scientificdevice. com

Sigma-Aldrich Corp.
3050 Spruce St.
St. Louis, MO 63103
314-771-5765
http://www. sigmaaldrich. com

本报告中的发现和结论均来自于作者，不一定代表美国疾病预防和控制中心(CDC)的官方观点。所用的商品名和商品化资源仅适用于鉴定，不表示获得了CDC的支持。

参考文献请扫二维码查阅

第119章 真菌直接检测和鉴定的常规方法*

H. RUTH ASHBEE

（黄磊 译；福泉、陆玲 审校）

侵袭性真菌病的发病率在过去十年内显著增加，能够快速检测和鉴定致病性真菌对于成功处理此类疾病十分重要[1]。真菌培养对于明确感染的病原体一直具有重要作用，而其他非培养的方法则可提供更加及时的结果，比培养技术更有优势。本章所综述的非培养方法包括直接显微镜检查、抗体和抗原检测、检测(1,3)-β-D-葡聚糖和其他真菌代谢物、质谱的应用和核酸检测。尽管这些方法对临床应用很有帮助，但目前尚不能完全取代培养方法，应与合适的培养方法联合使用(在本书第117和118章已有论述)。虽然侵袭性感染中用培养方法得到的阳性率较低，但一旦得到阳性培养就可以进行药敏试验和流行病学比较研究，这些在使用非培养方法时不可行。

一、直接显微镜检查

能否从临床标本中检测到真菌取决于很多因素，其中包括实验室接收到的标本质量。如果送检标本量过少，仅含极少量真菌，会使检测和鉴定结果更加不可靠。如果不是取材自典型的病灶部位，可能在所取材部分的标本中无法分离到真菌。当收到很少量标本时，通常培养应优先于直接镜检，因为培养的敏感性更高。皮肤标本为例外，其显微镜检查具有诊断意义，此外，如果怀疑毛霉而未得到阳性培养结果时，镜检可能呈阳性。如果标本足够大，应同时做直接显微镜检查和培养，因为镜检能更好地区分定植、组织侵袭和污染。反之，当患者接受抗真菌治疗时，在获得的标本中可能仅有失活的微生物，此时显微镜检查和分子技术可能是检测病原体的唯一方法。当多个临床实验室处理同一标本的不同部分时，标本的数量和质量可能受到影响。临床微生物实验室、病理实验室和临床医生之间良好的沟通可极大地提高诊断准确性。

当检测和鉴定某些地方流行性疾病的致病真菌时，应考虑患者的旅行史和居住地。对于居住在非地方病高发区的患者，既往的全部旅行史很重要，因为某些感染(例如，副球孢子菌病、组织胞浆菌病)[2]可在几十年后再活化。特定的旅行或居住地细节可提高诊断的准确性，例如，足菌肿虽然世界各地均有报道，大多数病例来自环绕北回归线的热带和亚热带地区[3]。

临床标本能提供很多信息，在未进行任何处理之前，应先检查标本，记录干酪样坏死、微小脓肿、谷粒样或颗粒样物质和结节的位置。谷粒和颗粒样物质提示足菌肿，肉芽肿和干酪样坏死提示组织胞浆菌病，而微小脓肿见于慢性播散性或肾的念珠菌病。应检查谷粒和颗粒样物质的颜色、形状、大小和连续性，这些可能对病原体有提示作用。例如，常引起真菌性足菌肿的尖端赛多孢霉(*Scedosporium apiospermum*)，可产生淡黄色至白色的直径1～2 mm的软谷粒样物质，而灰色限球壳(*Trematosphaeria grisea*)产生球状或分叶状的直径为0.5～1.0 mm的黑颗粒[3]。

标本的显微镜检查可使用非固定标本或固定染色标本。非固定标本具有快捷和操作相对简单的优点，固定染色标本可以突出某些特定真菌的特征及组织中宿主的反应，后者需要更长的处理过程，会延迟报告。通常情况下，对固定染色标

*本章包含Yvonne Shea在本手册第10版第14章中呈现的部分内容

本的检测，常规染色如苏木素-伊红（HE）染色可用于筛查。如HE染色后怀疑真菌，则应使用针对真菌特定结构的染色[如六胺银染色（GMS）]，而更加特殊的染色如黏蛋白胭脂红或丰塔纳-马森（Fontana-Masson）染色，用于显示感兴趣真菌的特征性结构。一系列染色和操作步骤可用于检测真菌（表119-1），组织病理学诊断的作用在近期已进行了全面的综述[4]。染色方法学总结详见本书第118章。

表119-1 临床标本中真菌直接显微镜检查和组织学检查所用的方法和染色

方法	应用	所需时间(min)	真菌的颜色	评论
在非固定的组织或标本中所使用的直接染色和方法				
氢氧化钾（KOH）	清洁和软化标本，以更容易地观察真菌	5～30	透明霉菌和酵母菌表现为透明，而暗色霉菌为金褐色菌丝	可与荧光素联合应用，行荧光显微镜检查
荧光增白剂	检测所有真菌和耶氏肺孢子（*Pneumocystis jirovecii*）的包囊	1～2	取决于所用滤光片，真菌结构为蓝白色或亮绿色，背景为暗色（图119-10，图119-12）。包囊中心有"双括号样"结构	需要荧光显微镜；胶原和拭子纤维也可发荧光，脂肪滴看上去像酵母细胞。复染色尽量减少背景荧光。产黑色素真菌不能有效着色
Diff-Quik	也可用于其他标本，如BAL、脑脊液	2～3	酵母细胞和滋养体为蓝-紫色（图119-15）	区别于利什曼原虫，利什曼原虫有动基体，而组织胞浆菌没有
印度墨汁，苯胺黑	检测脑脊液中的新型隐球菌（*Cryptococcus neoformans*）	1	环绕酵母细胞的荚膜表现为透明光环，而背景为黑色（图119-16）	当在脑脊液中阳性时，对脑膜炎具有诊断价值。在很多脑膜炎病例中阴性，不可靠
在加热或乙醇固定的标本或组织中染色				
吉姆萨染色	主要用于检查骨髓和外周血涂片	15	检测耶氏肺孢子菌（*P. jirovecii*）的滋养体阶段	检测细胞内的荚膜组织胞浆菌（*H. capsulatum*）和马尔尼菲篮状菌（*T. marneffei*）的裂殖酵母细胞（图119-26）
革兰染色	检测细菌和真菌	3	通常而言，酵母菌和假菌丝为革兰阳性，菌丝（有隔膜和无隔膜）为革兰阴性（图119-1至图119-7）。一些酵母菌，尤其是隐球菌可脱色，为革兰阴性或点彩样	隐球菌属在某些情况下染色很弱，仅表现为点彩，通常有橙色无定形物质围绕酵母细胞（图119-7），不是所有真菌都能检出
甲苯胺蓝	在呼吸道标本中检测耶氏肺孢子菌（*P. jirovecii*）	25	包囊壁为紫色（图119-18）	背景和其他真菌染成同样的颜色
巴氏	细胞学染色，主要用于检查恶性肿瘤细胞	30	取决于所检测的细胞类型，背景染色在很小范围内变化：蓝绿、橙至粉红色。念珠菌染为金色，其他真菌不着色	应行进一步染色
阿尔新蓝	检测脑脊液中新型隐球菌（*C. neoformans*）	2	荚膜染为蓝色，背景为浅粉色	黏多糖染色，不常用；类似印度墨汁，不能检出所有病例
在固定组织中的染色				
苏木素-伊红（HE）	常规目的，组织学染色	30～60	真菌胞浆为粉色，核为蓝色。暗色真菌为自然色素的颜色（图119-14，图119-17，图119-24），背景组织为红色	可观察宿主组织对真菌的反应。曲霉菌属和毛霉菌染色好。Splendore-Hoeppli现象可见于某些真菌，包括蛙粪霉属和孢子丝菌
过碘酸-雪夫（PAS）	检测真菌	20～25	真菌染为粉色至紫红色；核可为蓝色，取决于所用的复染色	PAS使糖原染色，其他组织结构表现为与酵母细胞类似
六胺银（GMS）	检测真菌，包括肺孢子菌	5～60	真菌结构包括肺孢子菌包囊，染为灰白色至黑色。背景为绿色（图119-9，图119-11，图119-13，图119-21）	经常使真菌着色太浓密无法观察到结构的细节。酵母细胞和肺孢子菌包囊的大小和形状类似

（续　表）

方法	应用	所需时间(min)	真菌的颜色	评论
黏蛋白胭脂红	使黏蛋白染色	60	隐球菌荚膜染为紫红色	也可使皮炎芽生菌和鼻孢子菌的细胞壁染色
氨银液(FM)	检测产黑色素的双相真菌和新型隐球菌	60	细胞壁为黑色；背景为淡粉色	很多非双相真菌(某些曲霉、毛霉、毛孢子菌)可 FM 阳性。如果在 HE 染色中为透明，应仔细检查其形态

革兰染色有助于诊断，已经被大多数实验室普遍应用，因此实验室人员熟悉该方法。革兰染色能在原始标本中区分酵母菌和霉菌。尽管革兰染色反应可能发生变化，酵母细胞和假菌丝通常染为革兰阳性，菌丝(有隔和无隔)染为革兰阴性。出芽酵母样细胞的大小和形状提示可能的菌属鉴定。隐球菌通常为圆形，表现为无定形的橙色物质，推测可能是荚膜。

熟悉组织内某些真菌的外观，对直接镜检会有帮助(表 119-2)。曲霉菌丝具有比较一致的直径(4～6 μm)，通常呈 45°角分枝，较少见呈 90°角分枝。镰刀菌属(*Fusarium*)和赛多孢霉属(*Scedosporium*)看上去非常像组织内的曲霉菌属(*Aspergillus*)[5]。真菌在组织内产孢子很少见，但某些真菌具有典型的该特征。例如，粉孢子(侧生孢子)可提示土曲霉(*Aspergillus terreus*)，镰刀菌(*Fusarium*)可同时产生菌丝和酵母样结构，赛多孢菌属(*Scedosporium*)可产生椭圆形、有色素的环痕孢子[4]。当真菌染色同时出现单细胞形式和细丝状结构(表现为菌丝或假菌丝)时，应考虑镰刀菌(*Fusarium*)、拟青霉(*Paecilomyces*)或帚枝霉属(*Sarocladium*)感染的可能，同时也应鉴别丝状酵母菌[6]。毛霉菌丝可无隔膜或仅有少量隔膜伴宽角分枝。由于缺少隔膜，无支撑的菌丝通常表现为扭曲、扁平状[7]。HE 染色出现菌丝外围环绕嗜伊红样物质(Splendore-Hoeppli 现象)，可见于芽生菌病和孢子丝菌病，以及由蛙粪霉属(*Basidiobolus*)和耳霉属(*Conidiobolus*)引起的感染。这种现象是由组织中无定形的嗜伊红样物质经抗原-抗体反应沉积所引起的。暗色霉菌可表现为多种形态，例如具有平行状的壁分隔的菌丝、排列成链状的圆形体或砖格状(硬化)体。只有观察到产色素的菌丝才能诊断暗色丝孢霉病。有时色素沉着可使用传统的氢氧化钾涂片进行观察；荧光增白剂的使用应引起格外注意，因为产黑色素的菌丝吸收染料效果不佳。某些结构能够确诊病原体，如球孢子菌属(*coccidioides*)的内包囊。从接受抗真菌药物治疗的患者中采集的标本内，真菌可表现出不典型的结构，例如，同一菌丝出现大小不一的变异，菌丝内缺少隔膜，在菌丝内或菌丝一端出现菌丝球体。

当进行直接显微镜检查时，很多人造物会被误认为真菌结构。脑脊液中的淋巴细胞可被误认为隐球菌属[8]；纤维和碎片在荧光增白剂下可发出荧光，会被误认为菌丝；脂肪滴也可被误认为出芽的酵母样细胞。直接显微镜阅片经验的积累能克服以上问题，当存在疑问时，同事间应进行讨论，或使用其他方法区分人造物与真正的真菌结构。

直接显微镜检查的阳性结果应立即报告，并应提供尽量多的必要信息以阐明结果。例如，对于“可见酵母细胞”的报告，如果在皮肤标本中发现特征性的宽基底出芽，对临床更有帮助的报告方式为“显微镜检查可见共生菌群，例如马拉色菌(*Malassezia*)”。真菌感染的临床标本行直接显微镜检查时，所观察到各种特征性结构的举例见图 119-1 至图 119-26。像直接镜检一样，其他各种方法也可用于在临床样本和血培养中检测真菌，这些列举见表 119-3。

二、抗体检测

抗体检测在多种疾病都适用，尤其是免疫正常患者，而在免疫缺陷患者中的作用有限。真菌感染时，有多种免疫学技术用于检测抗体，包括免疫扩散法(immunodiffusion，ID)、反向免疫电泳(countercurrent immunoelectrophoresis，CIE)、酶联免疫吸附试验(enzyme-linked immunosorbent assays，ELISA)、补体固定试验(complement-fixation tests，CFTs)和最近出现的荧光酶免疫试验(fluorescent-enzyme immunoassay，FEIA)。

表 119-2 通过直接检查临床标本观察到的真菌形态学特征

观察到的真菌形态	微生物	直径范围(μm)	典型的特征	地域分布
酵母形态	荚膜组织胞浆菌(*Histoplasma capsulatum*)	2～5	小;椭圆形或圆形的出芽细胞;经常在组织细胞内成簇出现;数量少时不易被检出;经常在细胞内(图 119-23)	1. 世界范围,美国的东部(位于俄亥俄州和密西西比河流域)、墨西哥,以及美洲中部和南部 2. 非洲热带地区(加蓬、乌干达、肯尼亚)
	孢子丝菌(*Sporothrix*)	2～6	小;椭圆、圆形或雪茄烟形;可出现一个或多个芽;在临床标本中不常见(图 119-21)	大多数报道来自墨西哥、美洲中部和南部(巴西)、亚洲(日本)。在温带和热带地区更常见
	隐球菌属(*Cryptococcus*)	4～10	细胞大小不一;常呈球形,但也可呈足球形;出芽常为单个并有压痕;可有明显或不明显的荚膜;极少可见有或无荚膜的假菌丝(图 119-7,图 119-15,图 119-16)	新型隐球菌:世界范围,尤其是欧洲、非洲、澳洲 格特隐球菌:热带或亚热带地区,包括澳洲、美洲、非洲南部、美洲中部
	皮炎芽生菌(*Blastomyces dermatitidis*)	8～15	细胞较大,呈球形,具有双折光性;出芽常为单个,但仍有数个连接于母胞;芽与宽大的基底相连(图 119-22)	美国的东南部和中南部,大湖区,圣劳伦斯河附近
	巴西副球孢子菌(*Paracoccidioides brasiliensis*)	5～60	细胞较大,并被周边的小芽围绕(车轮状);也可出现类似荚膜组织胞浆菌的小细胞(2～5 μm);芽有压痕(图 119-25)	美洲南部和中部
酵母样形态(裂殖)	马尔尼菲篮状菌(以前称青霉菌)(*Talaromyces marneffei*)	3	裂殖酵母,不出芽,伸长,弯曲可见隔膜(图 119-26)	东南亚部分国家和中国
包囊和滋养体	耶氏肺孢子菌(*Pneumocystis jirovecii*)	1～4; 4～5	滋养体:小、多形性 包囊:圆形、杯形,有多至 8 个囊内小体(图 119-18)	世界范围
小球体	粗球孢子菌(*Coccidioides immitis*),波萨达斯球孢子菌(*Coccidioides posadasii*)	10～200	大小不一的小球体,一些含内生孢子,其他为空的、呈崩解状态;受损腔内可见菌丝(图 119-24)	美国西南部,墨西哥,美洲中部和南部地区(波萨达斯球孢子菌为非加利福尼亚菌株)
酵母相伴假菌丝或真菌丝	念珠菌属(*Candida*)	3～4(酵母相); 5～10(假菌丝)	细胞常为单个出芽(图 119-4,图 119-6);有假菌丝时会局限在一端而仍相连,类似香肠的连接状(图 119-4,图 119-5);当有真菌丝时,壁平行,并有隔膜分开	世界范围
酵母样,假菌丝	马拉色菌属(*Malassezia*)	3～8(酵母); 5～10(假菌丝)	菌丝成分短而弯曲,可与圆形、椭圆形或伸长的酵母细胞共存,该酵母细胞在分生孢子形成时一端呈圆形且扁平(图 119-8)	世界范围
野生少隔菌丝	毛霉菌目的霉菌(*Mucoraceous* moulds)	10～30	菌丝大,带状,常有折断或扭曲。偶尔可见隔膜,常在适当角度形成分枝(图 119-3,图 119-11,图 119-12)。蛙粪霉菌属和耳霉属在 HE 染色涂片可见 Splendore-Hoeppli 现象	虫霉菌属:世界范围;蛙粪霉:亚洲热带地区,非洲、美洲地区(主要是巴西)、墨西哥、澳洲地区[155],冠状耳霉和异孢耳霉:非洲和东南亚的热带和亚热带地区(成人)

（续　表）

观察到的真菌形态	微生物	直径范围(μm)	典型的特征	地域分布
透明(无色)有隔菌丝	皮肤癣菌(*Dermatophytes*)(皮肤和甲)	3～15	经常可见透明有隔菌丝；可出现呈链状的关节孢子(图 119-19)	世界范围
	皮肤癣菌(*Dermatophytes*)(毛发)	3～12	毛发外周的关节孢子产生鞘样结构表明毛外癣菌感染。毛发内通过菌丝分节而产生关节孢子表明毛内癣菌感染。长菌丝体或毛发内的沟状结构表明黄癣毛发感染	
透明有隔菌丝	曲霉菌属	4～6	曲霉菌属通常有直径相等的分隔；经常表现为反复叉状分枝，呈45°角(图 119-1，图 119-9，图 119-10，图 119-13，图 119-14)	世界范围
	丝孢菌属(*Scedosporium*)(不是真菌性足菌肿)，镰刀菌属(*Fusarium*)，拟青霉属(*Paecilomyces*)	3～12	菌丝有隔，与其他透明的霉菌难以区分。可表现为小于45°角或大于90°角的分枝	
暗色(深色色素沉着)有隔菌丝	暗色真菌(*Dematiaceous fungi*)	1.5～6.0	暗色多形性菌丝，单一隔膜的出芽细胞，可见串珠状被吞噬的圆形细胞。当感染由瓶霉属或外瓶霉属引起时，偶尔可见聚集体(图 119-2)	威尼克外瓶霉(*Exophiala werneckii*)：亚热带沿海地区；毛干结节菌(*Piedraia hortae*)：美洲中南部、东南亚、南太平洋岛屿的热带气候
硬核(砖格状细胞)	卡氏枝孢瓶霉(*Cladophialophora carrionii*)，紧密着色霉(*Fonsecaea compacta*)，裴氏着色霉(*Fonsecaea pedrosoi*)，疣状瓶霉(*Phialophora verrucosa*)，播水喙枝孢霉(*Rhinocladiella aquaspersa*)	5～20	褐色、圆形至多形性、含横向隔膜的厚壁细胞。通常细胞含两个分裂板，形成四分体。除硬核外，偶尔可见分枝的有隔菌丝(图 119-20)	世界范围发生；大多数报道的病例来自美洲和非洲的热带和亚热带地区
颗粒(白色谷粒样的真菌)	枝顶孢属(*Acremonium*)和相关的种属：帚枝霉(*Sarocladium kiliense*)，瑞塞菲支顶孢菌(*Acremonium recifei*)	200～300	白色，细颗粒；无水泥样基质	亚洲，美洲北部、南部和中部，大洋洲，欧洲
	构巢曲霉(*Aspergillus nidulans*)	65～160	白色，细颗粒；无水泥样基质	非洲
	镰刀菌属(*Fusarium*)，串珠镰孢菌(*F. moniliforme*)，尖孢镰刀菌复合种(*F. oxysporum species complex*)，茄病镰刀菌复合种(*F. solani species complex*)	80～200	颗粒为白-黄色，边缘完整或有分叶；周围有嗜酸性的均质性物质。构成颗粒的菌丝不包裹在基质中	欧洲、南美洲、加勒比海、非洲、亚洲
	罗萨梯新龟甲形菌(*Neotestudina rosatii*)	500～1000	圆形，卵圆形或分叶状的白色颗粒；在基质中心结构很紧密	非洲西部

（续 表）

观察到的真菌形态	微生物	直径范围(μm)	典型的特征	地域分布
	波氏假阿利什菌(*Pseudallescheria boydii*)	1000～2000	白-黄色，水泥样基质外周的菌丝和被吞噬的细胞组成细颗粒(图 119-17)	世界范围，北美最常见
颗粒(黑色谷粒样的真菌)	弯孢霉属(*Curvularia* spp.)，膝曲弯孢霉(*C. geniculata*)，新月弯孢霉(*C. lunata*)	500～1000	黑色，粗颗粒，外周有水泥样基质	世界范围
	甄氏外瓶霉(*Exophiala jeanselmei*)	500～1000	黑色，细颗粒，有空泡，无水泥样基质，由深色菌丝被吞噬的细胞组成	世界范围
	塞内加尔小球腔菌(*Falciformespora senegalensis*)，汤普金小球腔菌(*Falciformespora tompkinsii*)	400～600	黑色，细颗粒，有水泥样基质；在组织中，中心部分由菌丝组成，外周可见黑色水泥样物质	非洲西部(特指塞内加尔和毛里塔尼亚)
	灰色限球壳(*Trematosphaeria grisea*)	300～600	黑色，细颗粒，颗粒外周可见棕色水泥样物质	印度，以及非洲、美洲中部和南部国家
	足菌肿马杜拉霉(*Madurella mycetomatis*)	500～900	两种类型的黑色至棕色粗颗粒：①铁锈色或棕色，致密，充满水泥样基质；②深棕色，充满大量囊泡，直径 6～14 μm，外周有水泥样基质，中心区为浅色菌丝	印度，以及非洲、美洲南部国家
	Medicopsis romeroi，*Biatrospora mackinnonii*	(40～100)×(50～160)	黑色，细颗粒由外周多边形的被吞噬细胞组成，有水泥样基质	印度，以及非洲、美洲南部国家

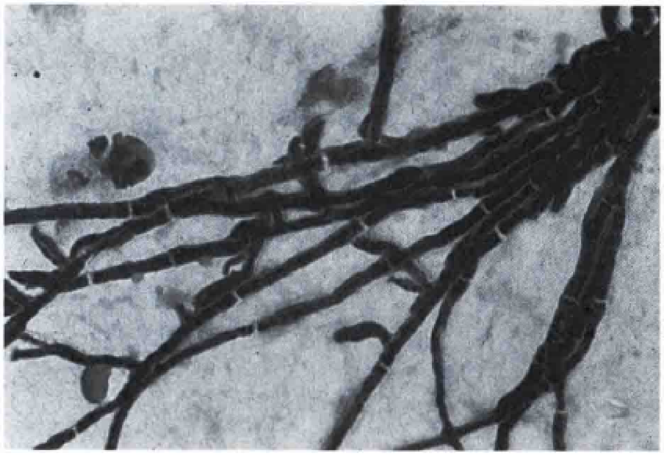


图 119-1　革兰染色的肺泡灌洗液，为烟曲霉(*Aspergillus fumigatus*)革兰阴性分枝状的有隔菌丝，放大倍数约为×1000，见彩插



图 119-2　革兰染色的皮肤活检标本，为革兰染色阴性或阳性不定的甄氏外瓶霉(*Exophiala jeanselmei*)分枝样菌丝，放大倍数约为×1000，见彩插

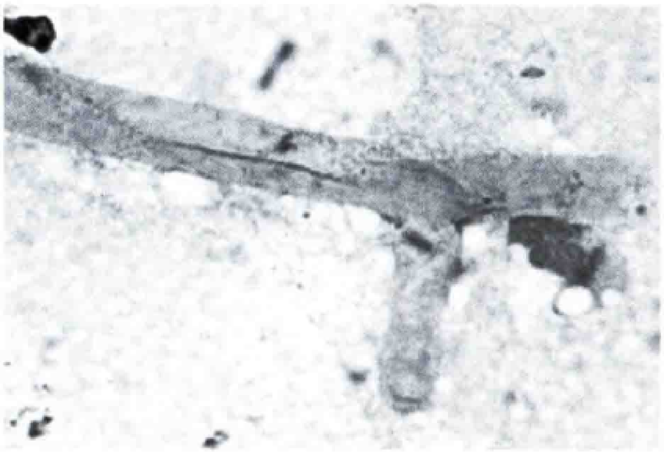


图 119-3　革兰染色的皮肤活检标本，为小孢根霉(*Rhizopus microsporus*)群的革兰阴性无隔菌丝，放大倍数约为×1000，见彩插

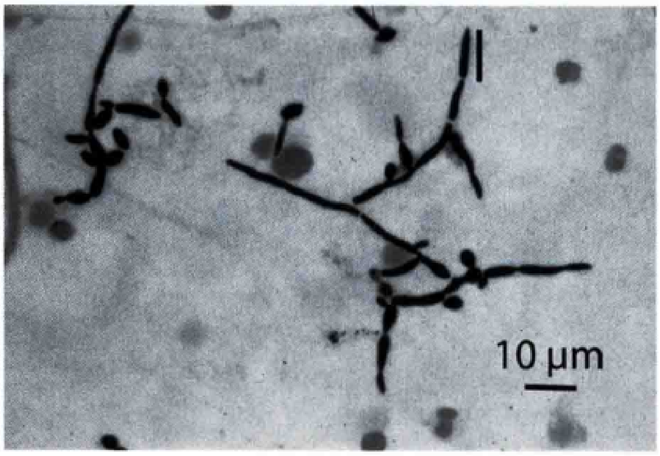


图 119-4　革兰染色的痰标本，为白念珠菌(*Candida albicans*)，可见革兰阳性出芽的酵母细胞，有假菌丝，见彩插

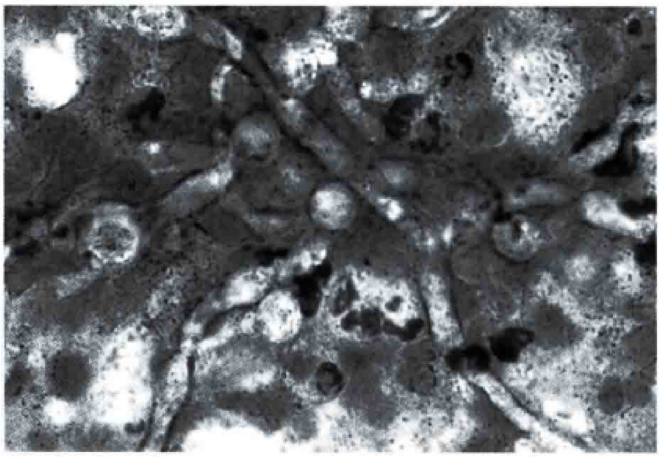


图 119-5　革兰染色的脾，表现为鬼影样出芽的酵母样细胞，有假菌丝，放大倍数约为×1000，见彩插

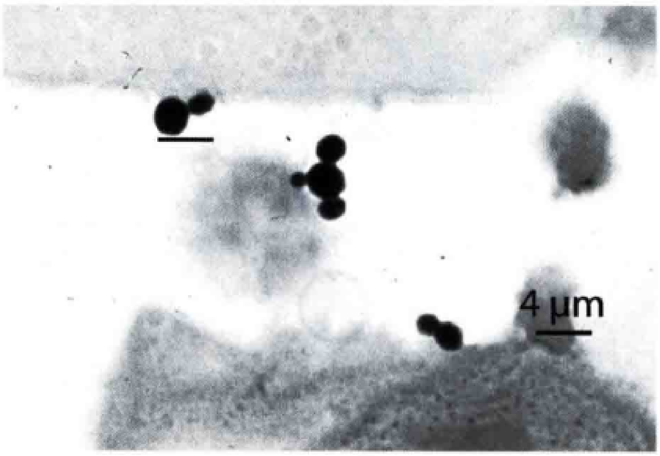


图 119-6　革兰染色的阴道分泌物，可见革兰阳性出芽酵母细胞，为光滑念珠菌(*Candida glabrata*)，见彩插

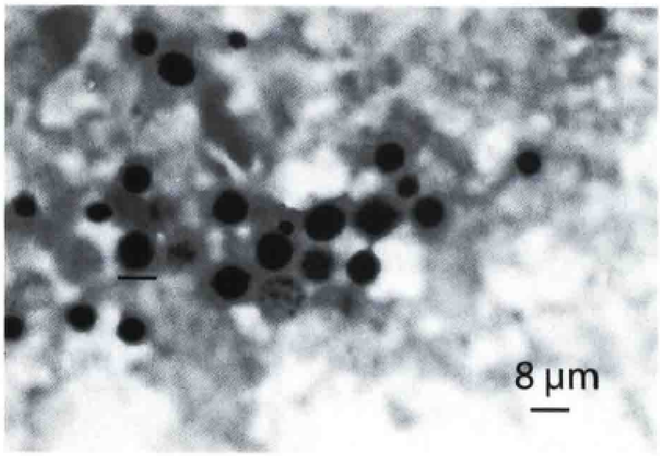


图 119-7 革兰染色的皮肤脓肿，新型隐球菌（*Cryptococcus neoformans*）为革兰阳性或阴阳性不定的出芽酵母细胞，大小不一，环绕有无定型的橙色光环，见彩插

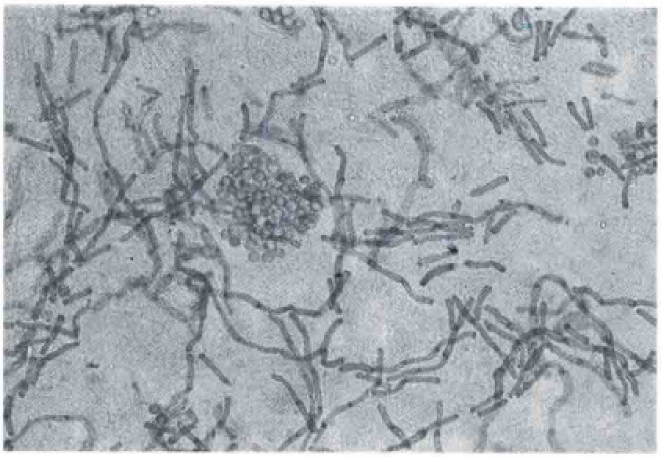


图 119-8 派克墨汁染色的皮肤损伤处标本，为典型的酵母细胞，是马拉色菌属（*Malassezia*）短而粗的菌丝，放大倍数约为×400，见彩插



图 119-9 GMS 染色的 BAL 标本，显示为烟曲霉（*Aspergillus fumigatus*）二分叉状的有隔菌丝，放大倍数约为×400，见彩插

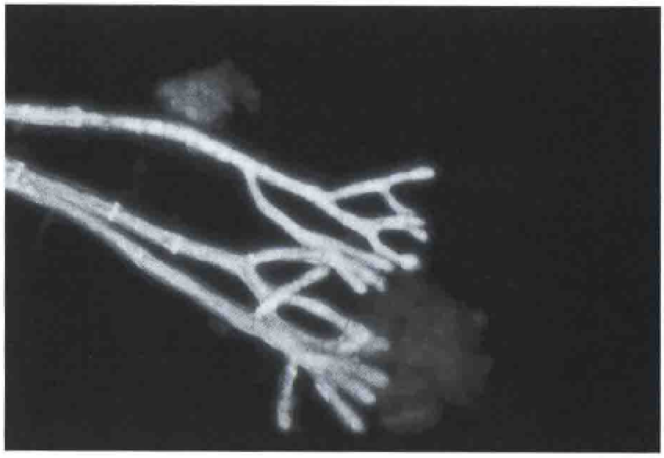


图 119-10 荧光增白剂染色的 BAL 标本，显示为烟曲霉（*Aspergillus fumigatus*）二分叉状的有隔菌丝，放大倍数约为×500，见彩插



图 119-11 GMS 染色皮肤活检标本的根霉（*Rhizopus*），显示为带状菌丝，放大倍数约为×400，见彩插

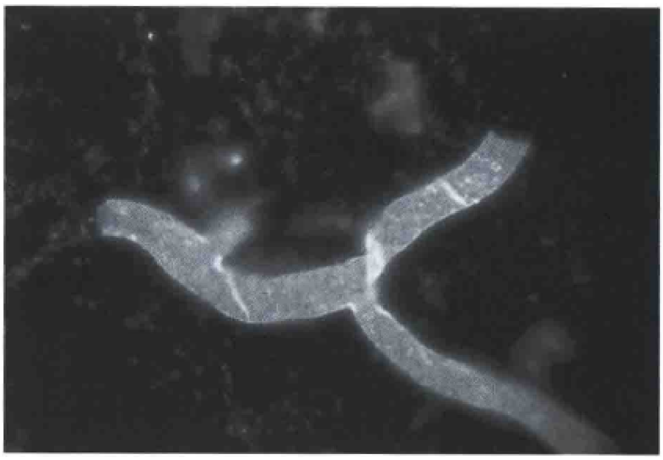


图 119-12 荧光增白剂染色的根霉菌属（*Rhizopus*），显示为带状菌丝，放大倍数约为×500，见彩插



图 119-13　GMS 染色的肺活检标本，显示为烟曲霉（*Aspergillus fumigatus*），菌丝一端形成球茎样结构，放大倍数约为×1000，见彩插

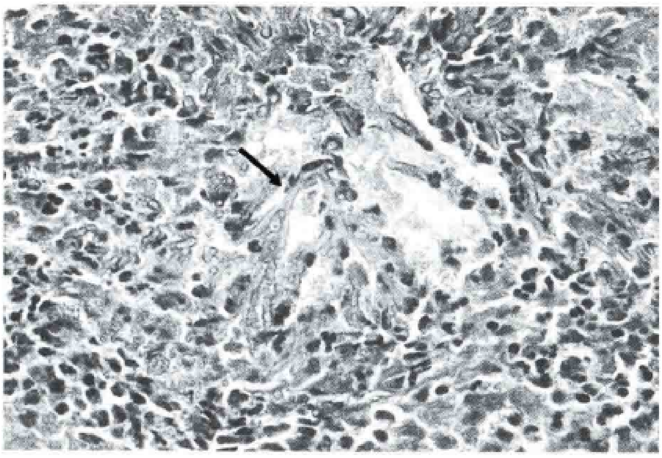


图 119-14　HE 染色的肺活检标本，显示为烟曲霉（*Aspergillus fumigatus*）二分叉状的有隔菌丝（如箭头所示位置），放大倍数约为×400，见彩插

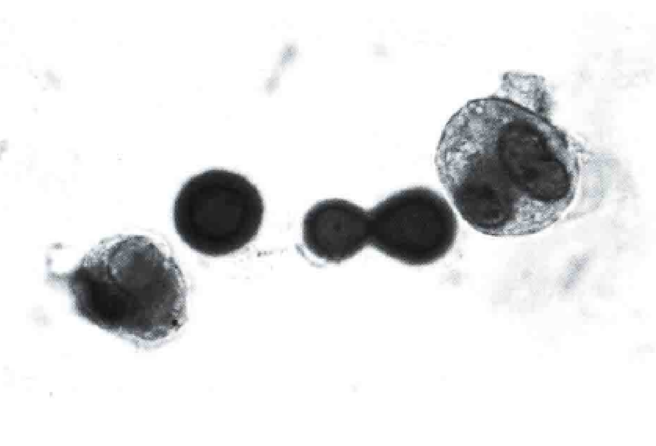


图 119-15　Diff-Quik 染色的脑脊液新型隐球菌，放大倍数约为×400，见彩插

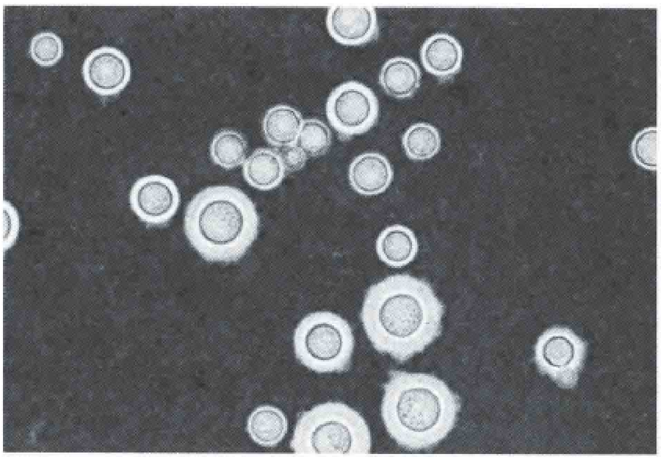


图 119-16　印度墨汁染色的脑脊液，为新型隐球菌有荚膜的出芽酵母细胞，放大倍数约为×400，见彩插

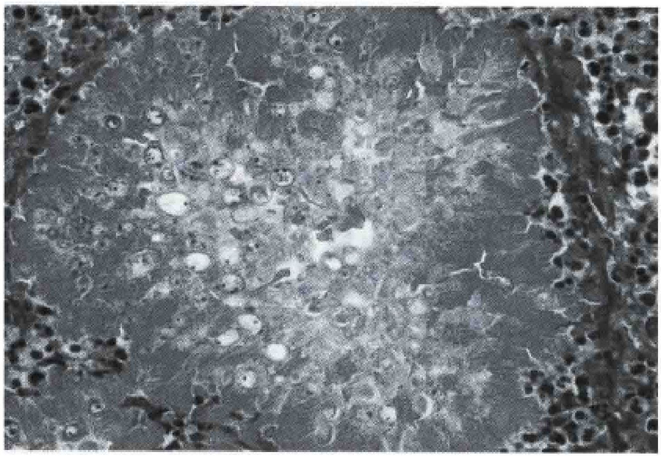


图 119-17　HE 染色，为尖端赛多孢霉（*Scedosporium apiospermum*）的真菌足菌肿颗粒，放大倍数约为×400，见彩插

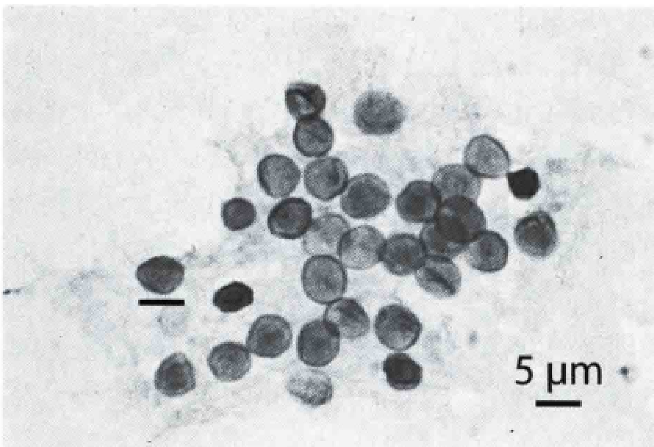


图 119-18　甲苯胺蓝染色的 BAL 标本，为耶氏肺孢子菌的包囊，见彩插



图 119-19 荧光增白剂染色的足趾甲标本，为红色毛癣菌(*Trichophyton rubrum*)的关节孢子和菌丝，放大倍数约为×200，见彩插

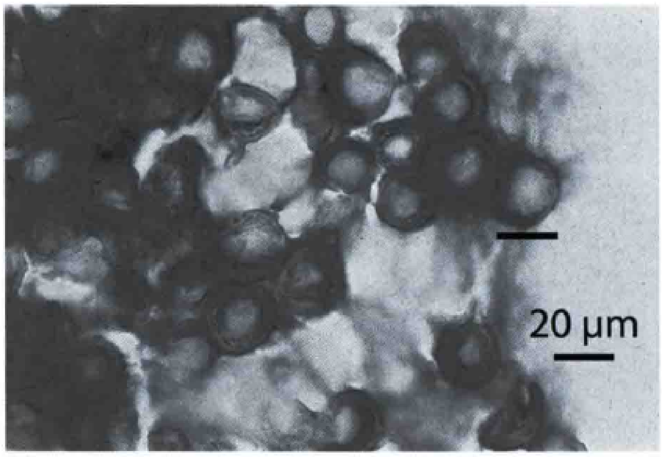


图 119-22 革兰染色的脓肿标本，为宽大基底的出芽酵母细胞，有厚而折光性的细胞壁，是皮炎芽生菌(*Blastomyces dermatitidis*)的典型特征，见彩插

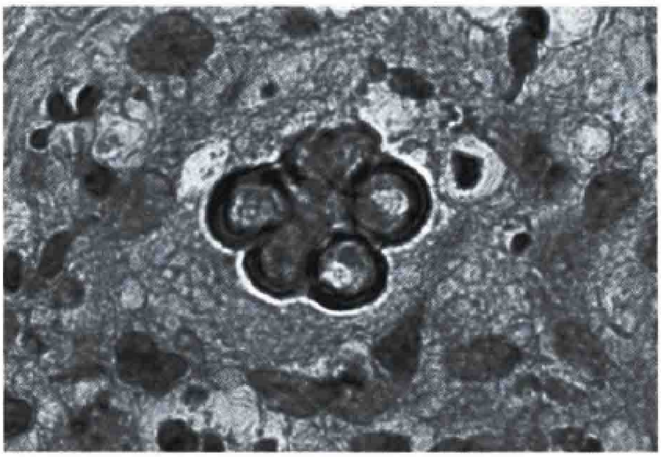


图 119-20 着色芽生菌病的组织中裴氏着色霉(*Fonsecaea pedrosoi*)砖格样(硬化)细胞(铜片状)，放大倍数约为×1000，见彩插

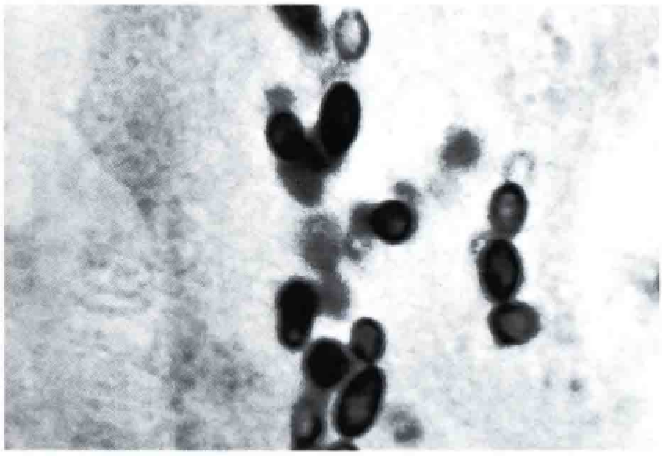


图 119-23 GMS 染色的淋巴结，为荚膜组织胞浆菌(*Histoplasma capsulatum*)的芽生孢子，放大倍数为×625，见彩插

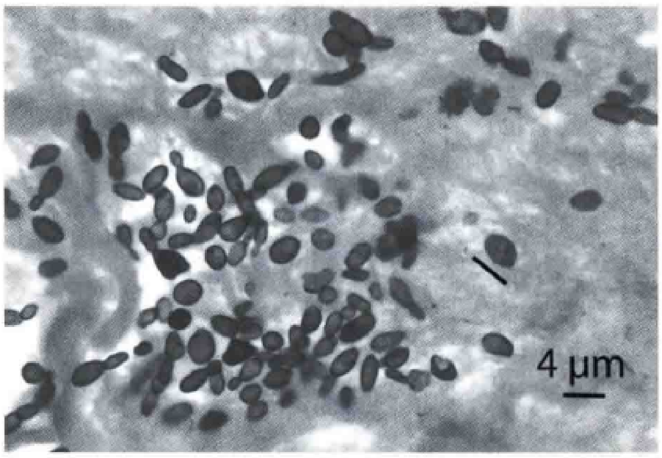


图 119-21 GMS 染色的淋巴结，为申克孢子丝菌(*Sporothrix schenckii*)特征性的雪茄烟状酵母细胞，见彩插

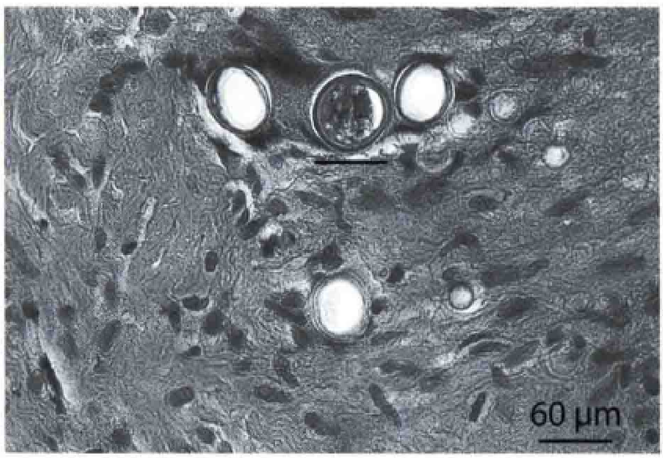


图 119-24 HE 染色的粗球孢子菌(*Coccidioides immitis*)，大而圆的厚壁内包囊(直径为 10～80 μm)，内部填充了内生孢子(直径为 2～5 μm)，早期的内包囊有明显的中心、外周细胞质和典型厚壁，见彩插

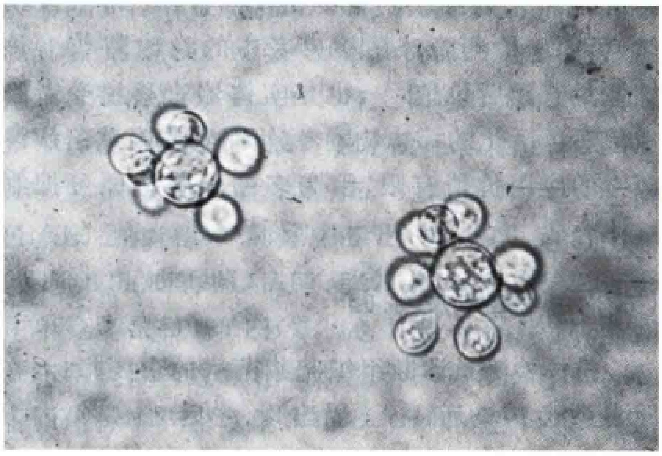


图 119-25　明亮视野的显微照相，为巴西副球孢子菌（*Paracoccidioides brasiliensis*），有多个出芽的酵母细胞，似车轮，放大倍数为×1590，见彩插

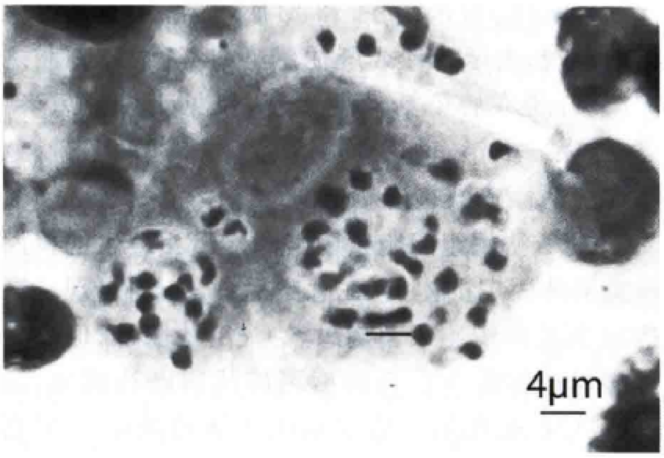


图 119-26　怀特-吉姆萨染色的肺泡灌洗液标本，为马尔尼菲篮状菌（*Talaromyces marneffei*）特征性的裂殖酵母细胞，见彩插

表 119-3　在血培养和临床样本中检测真菌的平台

平台	从临床样本中检测	从血培养中检测
直接显微镜检查	是	是
组织病理学染色	是	否
抗体检测	是	否
抗原检测	是	否
β-D-葡聚糖	是	否
真菌特异性代谢物	是	否
质谱	是	是
核酸检测	是	是

(一)曲霉菌属

大多数健康人因暴露于含有曲霉孢子的空气中，体内都能检测到抗曲霉菌抗体[9]，但该抗体对于诊断免疫抑制患者曲霉菌病的作用很小（第 122 章）。与此相反，对非粒缺患者的曲霉菌病，抗体检测是有用的。目前已有多项技术用于检测该抗体，包括反向免疫电泳和 FEIA 法[10]，这些试验主要检测 IgG。虽然有一家厂商（Platelia Aspergillus IgG；Bio-Rad，Hercules，CA）使用重组抗原，但不确定的抗原制备物经常被实验室使用。抗体检测有助于诊断过敏性支气管-肺曲霉菌病[9]、曲霉球病[11]和慢性空洞性曲霉菌病[12]，它们的应用情况最近已有大量综述[9]。尽管抗体的本底水平确实存在，但可通过仔细检查试验操作（如用受试者工作曲线分析），有可能确定一个较低的、无临床意义的抗体水平和另一个较高的、能提示疾病的抗体水平[13]。

已有 CE 认证的测定曲霉 IgG 的商品化 EIA 试剂盒（Platelia Bio-Rad；Hercules，CA），但尚未经美国 FDA 批准。该试剂盒定义抗体水平＜5 U/ml 为阴性，≥10 U/ml 为阳性，两者之间为中间缓冲区（intermediate）。然而生产商提供的试剂盒性能的评估数据来源于囊性纤维化患者，尚不清楚对过敏性支气管-肺曲霉菌病的诊断价值，以及其敏感性和特异性数据的可靠性。

(二)芽生菌属

芽生菌产生 2 种抗原，A 抗原和 WI-1 抗原，已有的商品化试剂盒仅能检测前者。免疫扩散、CFT 或 ELISA 法可用于检测芽生菌抗体，均有商品化的试剂盒和试剂（Gibson Biosciences，Lexington KY；IMMY，Norman，OH；Meridian Diagnostics，Cincinnati，OH）。免疫扩散法在 28%～64%患者中呈阳性，但 CFT 法的价值更小，仅在少于 20%患者中阳性[14]。EIA 法在 83%芽生菌病患者中可检出抗体，但在 47%组织胞浆菌病患者样本中也呈阳性[15]。一项更有希望的研究是检测 BAD1 抗原的抗体，它是一种表面蛋白抗原，敏感性为 88%，特异性为 99%，50 例组织胞浆菌病患者中仅有 3 例为阳性[16]。然而作者评论，联合抗原检测为最佳的诊断方法。也另参考第 125 章的信息。

(三)念珠菌属

念珠菌为人体携带的正常菌群，正常人即使

没患病在体内也存在低水平抗体，因此检测念珠菌特异性的抗体作为诊断工具是有问题的[17]。所用的主要抗原是甘露聚糖，为细胞壁组分，可检测IgG、IgM和IgA等多种免疫球蛋白。很多研究评价了抗体检测用于诊断侵袭性念珠菌病，令人失望的是其敏感性和特异性均较低[18-19]。已有报道，单独使用抗体进行诊断的敏感性仅62%，特异性53%，因此，多数专家目前建议抗体检测应与念珠菌甘露聚糖抗原检测联合使用[19-20]。

(四)球孢子菌属

诊断球孢子菌病有多种方法，包括抗原或抗体检测，或培养检测。尽管培养仍然是金标准方法，但它对操作该过程的实验室工作人员来说存在固有的风险，因此鼓励使用其他方法。球孢子菌抗体可通过多种方法检测，包括免疫扩散法、乳胶凝集(latex agglutination，LA)法、CFT法和EIA。在历史上也使用过试管沉淀法[21]，但目前已被使用相同抗原的ID试验取代。ID试验主要检测针对β-葡萄糖苷酶抗原的IgM抗体("加热的球孢菌素")，在疾病早期即阳性；而CFT法检测热不稳定几丁质酶抗原的IgG抗体("未加热的球孢菌素")，有助于诊断急性和慢性疾病，并可判断预后[22]。早期研究表明，在原发性感染中，沉淀性抗体在感染第3周达到峰值，约90%血清学阳性，但随后很快消退，在第5个月仅有10%血清学阳性。第1个月末可在约50%的血清中检测到补体固定抗体，持续升高数月[23]。商品化的LA测试可从IMMY(球孢子菌乳胶凝集；IMMY，Norman，OH)和医学化学公司(球孢子菌乳胶凝集；Torrance，CA)获得，但IMMY警告：有出现假阳性的可能，结果应被另一种方法复核。

EIA法目前可用于检测IgG和IgM，可用血清或脑脊液标本(Premier Coccidioides EIA；Meridian，Cincinnati，OH)。EIA法比ID法和CFT法敏感性更高，但敏感性增加可能会使特异性降低[24]。其中一项研究未发现假阳性结果[25]，而其他研究发现在患者中有IgM假阳性结果[26]。因此，建议EIA法作为筛查工具，任何阳性结果都需要用另一种方法进行验证[22]。请参考第125章。

(五)隐球菌属

隐球菌抗体包括针对葡萄糖醛酸木糖甘露聚糖抗原和天然抗原制备物的IgG、IgM和IgA抗体，可用于检测隐球菌病患者中的隐球菌[27]。该抗体具有预后价值[28]，也是实体器官移植受者隐球菌病再活化的标志物[29]。然而其在隐球菌病诊断中的应用价值有限，因为多糖荚膜抗原可抑制抗体合成[30]。

(六)荚膜组织胞浆菌

抗体检测是诊断组织胞浆菌病的重要指标，在原发急性感染后4～6周出现，之后2～5年内下降[31]。ID法和CFT法已被广泛应用和评价。

试验中所用抗原是从真菌菌丝相的组织胞浆菌素中提取。试验中检测的两种抗原为M抗原(一种触酶)[32]和H抗原(一种β-葡萄糖苷酶)[33]。

ID试验敏感性为80%，检测针对特定抗原的沉淀性抗体，可产生H和M两条带。M带在感染期出现，表示急性或既往感染，持续数年。与之相反，H带在感染活动期出现，仅见于少数患者，可持续1～2年。如果同时检测到上述两条带，认为对活动性感染有诊断价值[34]。

CFT法用组织胞浆菌素和酵母相产生的抗原检测补体固定抗体，它在感染后3～6周出现。高达95%的组织胞浆菌病患者CFT法阳性，但滴度可能相对较低[35]。低滴度可能代表既往感染，滴度≥1∶32或增加4倍表示疾病活动期[31]。早期抗体针对酵母抗原，之后针对组织胞浆菌素，若无进一步暴露，数年内则逐步下降[34]。CFT法比ID法更敏感，但也存在更多交叉反应。已发现在曲霉菌病、芽生菌病、念珠菌病、球孢子菌病、副球孢子菌病、结核和其他细菌或病毒性疾病的患者中，CFT法有阳性反应[36]。存在类风湿因子和冷凝集素时，可能出现假阴性结果[37]。商品化的LA检测可从IMMY(Norman，OH)获得，用于诊断急性组织胞浆菌病时有很好的敏感性，但由于潜在的交叉反应，厂商建议用ID法或CFT法确认。其他多种试剂盒和试剂可从IMMY、Focus Diagnostics(Cypress，CA)和Meridian Diagnostics(Cincinnati，OH)获得。

三、抗原检测

(一)曲霉菌属

目前诊断侵袭性曲霉菌病(invasive aspergil-

losis,IA)已有商品化的试剂盒,主要的抗原为半乳甘露聚糖(galactomannan,GM)。GM 是含甘露糖骨架的糖分子,由体内生长的曲霉菌丝细胞壁中释放,直到侵入血管后才能在患者检测到[38]。GM 可在感染患者的血清、支气管肺泡灌洗液(BAL)、脑脊液[39]和尿中检出。由伯乐公司生产的 Platelia 曲霉菌 GM 抗原的 ELISA 检测试剂盒用单克隆鼠抗体(EBA-2)包被微量滴定板,并作为指示抗体与过氧化物酶结合。每份标本中 GM 含量用标本光密度值(OD)与对照光密度值(OD)的比值表示,GM 指数>0.5 为阳性(Platelia Aspergillus Ag Kit insert)。尽管生产商目前推荐 0.5 为试剂盒检测 BAL 标本的临界值,很多实验室仍以 1 作为临界值以提高试剂盒对 BAL 标本的敏感性。该试剂盒(经过 CE 认证,FDA 批准)目前已被批准用于血清和 BAL 的 GM 检测,并在多种患者人群中进行了广泛研究。在不同研究背景下,其敏感性和特异性变异较大。血液系统恶性肿瘤和造血干细胞移植(HSCT)术后患者比实体器官移植的患者通常具有更高的敏感性和特异性。对血液系统恶性肿瘤患者中已确诊或疑诊 IA 者,敏感性可高达 100%[40],但也有研究表明在确诊 IA 患者中敏感性仅为 17%[41]。最近一篇综述分析了 54 项研究,发现敏感性和特异性分别在 82%和 81%[42],可预料的是,使用更高的临界值使特异性升高,敏感性下降,但差异不具统计学意义。检测的频率也会影响该检测的使用,每周 2 次为最佳[43]。美国感染病学会(Infectious Disease Society of America,IDSA)关于曲霉菌病的指南建议,该试验用于在恶性血液肿瘤和造血干细胞移植患者中诊断侵袭性曲霉菌病,但它不应该用于筛查接受抗霉菌治疗的患者[44]。

GM 为侵袭性曲霉菌病的实用标志物,但也有很多因素会导致假阳性。哌拉西林/他唑巴坦或阿莫西林/克拉维酸[45]、勃脉力[46]、某些食品(包括意大利面、蔬菜、牛奶)都会造成假阳性,哌拉西林/他唑巴坦的假阳性问题目前已经大部分解决。此外,其他种属的真菌也会在该试剂盒中发生反应,包括青霉菌属(*Penicillium*)、链格孢属(*Alternaria*)、红酵母(*Rhodotorula*)、拟青霉属(*Paecilomyces*)、隐球菌属(*Cryptococcus*)、芽生菌属(*Blastomyces*)和组织胞浆菌(*Histoplasma*)。应减少对慢性肉芽肿疾病患者[47]及接受积极抗霉菌治疗的患者[48]检测 GM。

除用于诊断,GM 也可用作一项预后评估工具。早前研究表明,GM 指标升高与疾病进展相关[49],GM 持续高值患者比 GM 回落患者预后明显更差[50]。最近的研究表明,血清中 GM 初始水平和 GM 第 1 周衰减率可以预测死亡前存活时间。在第 1 周,如果 GM 指标增加 1 个单位,死亡风险增加 25%;而 GM 指标下降 1 个单位,风险下降 22%[51]。

尽管 ELISA 法检测 GM 是诊断侵袭性曲霉菌病最常用的试验方法,侧向流动装置(lateral flow device,LFD)(Isca Diagnostics,Truro,UK)为新开发技术,使用 JF5 单克隆抗体,可结合烟曲霉产生的胞外糖蛋白抗原的蛋白表位[52]。有猜想提出,通过结合非半乳甘露聚糖抗原的方法,减少交叉反应的问题。单克隆抗体用于捕获和检测血清或 BAL 中抗原,标本加入 LFD 后 10~15 min,可通过胶体金观察到线性带。仅生长菌丝可产生抗原,因此,曲霉菌孢子污染的标本(如 BAL)不会产生阳性结果。这在一项荟萃分析(Meta-analysis)中被证实,BAL 的敏感性和特异性(分别是 72%~86%和 84%~93%),要高于血清的敏感性和特异性(分别是 53%~68%和 81%~87%)[53]。

最近在 BAL 样本中 LFD 与 GM 的比较研究表明,敏感性为 88%,特异性为 84%~95%[54]。可能更重要的是,LFD 的阴性预测值高达 95%~96%,这可以做出更多关于停止治疗的知情决策。

尽管 LFD 被称为床旁检测[52],但是血清标本需要在含 EDTA 的 pH 缓冲液中煮沸,并在过程中离心,因此仍需在实验室内完成,但 BAL 样本可直接处理。该试剂盒经 CE 认证,目前正在进行 FDA 的审批。请参考第 122 章。

近期的几项研究表明,当 GM 试验与其他试验(如 PCR 或 β-D-葡聚糖)联合时,可获得最佳的敏感性和特异性[55-56]。

(二)芽生菌属

一般通过培养结果诊断芽生菌病,超过 80%患者最终为阳性,但培养物生长耗时长,其他方法也用于快速得到结果[57]。目前,芽生菌抗原仅有一种检测方法,由 Mira Vista Diagnostics(MiraVista Diagnostics,Indianapolis,IN)提供,是基于“一次检测一付费”的原则。它使用兔抗皮炎芽生

菌霉菌相全细胞抗体的双抗体夹心法[58]。该试验适用于大部分体液样本，主要评估过尿标本，其敏感性高于血清[59]。该试验的局限性是与其他真菌病的交叉反应，包括组织胞浆菌病、副球孢子菌病、马尔尼菲篮状菌病、隐球菌病和曲霉菌病(http://miravistalabs.com/medical-testing/blastomycosis)。最近该试验经改良后可进行抗原定量检测，提高了血清标本的检测敏感性，但在96%的组织胞浆菌病患者中会产生交叉反应[60]。组织胞浆菌病和皮炎芽生菌病的流行地区在美国有重叠，因此出现交叉反应会非常棘手。虽然该检测可用于检测治疗反应或复发[61]，但过高的交叉反应比率，使得芽生菌抗原检测的应用有限。请参考第125章。

(三)念珠菌属

念珠菌是很多人携带的正常菌群，诊断系统性念珠菌病较为困难，并且念珠菌定植也会影响目前诊断试验的敏感性和特异性。商品化的试验方法通常检测甘露聚糖或甘露糖蛋白，包括伯乐公司的 Platelia Candida Ag EIA 法和 CandTec 乳胶凝集试验(Ramco Laboratories，Stanford，TX)。念珠菌甘露聚糖很快从血液循环中被清除，因此频繁检测很重要。近期一项荟萃分析总结了关于敏感性、特异性的问题，以及定植对这些参数的影响，主要纳入了同时检测甘露聚糖抗原和抗甘露聚糖抗体的研究[20]。此项荟萃分析的问题之一是所纳入研究的异质性，反映在结果的很多方面。单独检测甘露聚糖抗原，敏感性范围为31%～100%，中位数62%。对于抗甘露聚糖抗体检测，敏感性范围为44%～100%。但当两种方法联合使用时，敏感性的中位数是86%。敏感性在不同种属的念珠菌间会有变化，白念珠菌的结果最好，随后为光滑念珠菌和热带念珠菌。荟萃分析包含了4项定植念珠菌病对结果影响的研究，发现定植和体表念珠菌病均与检出甘露聚糖或甘露糖蛋白抗体无关。因此推荐同时检测甘露聚糖和抗甘露聚糖抗体用于诊断侵袭性念珠菌病，联合检测优于单独使用其中任何一项。

(四)球孢子菌属

目前，已通过最充分验证用于检测球孢子菌抗原的试验为 Mira Vista 实验室提供的 EIA 法，它基于一次检测一次付费的原则(http://miravistalabs.com/wp-content/uploads/2012/09/315-TEST-PAGE-MVista-Coccidioides-Quantitative-Antigen-EIA.pdf)。Mira Vista 试验使用抗球孢子菌半乳甘露聚糖的抗体，适用于尿、血清、血浆、BAL、脑脊液标本和严重疾病患者的各种其他体液标本[62]。用 EDTA 处理血清和尿使免疫复合物游离，可将其血清中的阳性率从28%提高至73%，但尿中的阳性率仅有50%[63]。然而，正如地方性真菌病的其他几种抗原检测方法，在组织胞浆菌病和芽生菌病患者中也普遍存在交叉反应[63]。请参考第125章。

(五)隐球菌属

检测体液中隐球菌的荚膜多糖抗原是诊断隐球菌病的有机组成部分。所检测的抗原是葡萄糖醛酸-甘露聚糖，它是荚膜的主要组分，在不同血清型中结构存在差异。隐球菌属按经典的分类方法分为5个血清型，分别为A、B、C、D和AD型，而最近的分子生物学研究新定义了更多个型。建议使用“新型隐球菌属复合体”和“格特隐球菌属复合体”的名称来反映已报道的遗传学差异，并防止将来因为发现更多的遗传学差异而多次更名[64]。

已同时经 FDA 批准和 CE 认证，检测血清和脑脊液中隐球菌抗原的商品化试剂盒包括酶免疫分析法(Meridian and IMMY，Immuno-Mycologics，Norman，OK)和乳胶凝集试验(BioRad，IMMY，and Meridian)。EIA 法和 LA 试验的敏感性和特异性在血清和脑脊液中都很高，通常报道该值 > 90%[65-66]。隐球菌抗原检测也可使用 BAL[67]和尿标本[68]，但这些标本目前不作为常规检测。该抗原在 HIV 感染患者脑脊液中初始高滴度(≥1∶1024)提示预后不良[69]。尽管脑脊液中的抗原滴度会随时间下降，但下降速度过慢，而不能用于监测疗效[70]。同一标本使用不同试剂盒测定的滴度可能不同，因此实验室应使用单一来源的试剂盒。

最近 FDA 批准了一项用于血清和脑脊液标本的侧向流动装置(lateral flow device，LFD)(IMMY；Immuno-Mycologics，Norman，OK)[52]。与乳胶凝集试验[71]和 EIA 法[72]相比，LFD 的评估结果显示，其在血清标本中的敏感性增高。多

位作者注意到，LFD得到的滴度更高，因此与其他试剂盒的结果不具可比性。尽管尚未批准用于尿或脑脊液标本，但LFD在这些样本类型中也有很好的性能，敏感性在尿中为92%～100%[71-72]，在脑脊液中为99%[73]。与其他试剂盒相比[74]，LFD的优点是廉价、便于使用，尤其在资源紧缺的环境下。最近一项来自非洲的多中心评估研究表明，LFD对诊断疾病更加有优势[75]。取指尖血检测与全血检测的准确度相当[76]。

隐球菌抗原试剂盒已有多个导致假阳性和假阴性结果的因素被记录。假阳性结果可由消毒剂、肥皂[77]、琼脂[78]、细菌感染[79]、类风湿因子[80]、系统性红斑狼疮[81]和白吉利地霉(*Geotrichum beigelii*)感染[82]导致，而假阴性结果可能由抗原低滴度[83]或高滴度[84]导致。改良的试验方法通常可以克服上述问题[84-85]。由抗原高滴度引起的假阴性结果被认为是前带效应，合适的做法是同时检测未稀释标本和经1∶10稀释的标本。最近，使用侧向流动试验检测的低滴度样本时，会发生假阳性结果，而这几例患者之前没有诊断为隐球菌感染[86]。

(六)荚膜组织胞浆菌

组织胞浆菌病可通过不同的方法诊断，但与其他生长缓慢的真菌一样，用培养来诊断可能需要数周时间才能得到阳性结果[31]。其他诊断方法包括组织病理学、抗原检测、抗体检测和PCR，请参考第125章。最早的商品化组织胞浆菌抗原检测试验方法(MiraVista Diagnostics)，是由80年代中期的放射免疫测定方法发展而来，现在是EIA法。该试验使用多克隆兔抗血清，针对感染期多种体液内的荚膜组织胞浆菌多糖抗原[87]。试验敏感性随患者人群不同而变化，最主要的临床经验来自HIV感染患者和真菌播散性感染患者，这些患者的尿和血清中抗原阳性率分别为95%和86%。在其他免疫功能低下患者中，该试验的敏感性较低，尿标本为82%，血清标本为60%[88]。该试验仅用于早期诊断在暴露3周内的急性组织胞浆菌病。除播散性组织胞浆菌病外，该抗原检测也可用于急性肺部疾病，在血液和尿中的阳性率分别为68%和65%[89]。该试验很少应用于其他形式的组织胞浆菌病，对纵隔或慢性肺病的敏感性仅15%或更低[88]。除了血清和尿，对BAL和脑脊液标本也进行过评估。一项最近的研究表明，组织胞浆菌病患者的BAL标本中抗原检测阳性率为94%，而相同患者的尿和血清标本阳性率分别为79%和65%[90]。尽管尚无大样本量的研究评价脑脊液中抗原检测的敏感性，有小样本病例系列报道，其敏感性为38%～67%[91]。

治疗有效则抗原滴度下降[92]，复发则再次升高[93]，所以该试验也可用于判断预后。

抗原检测的一个主要缺陷是假阳性结果的发生率高。在芽生菌病、副球孢子菌病和马尔尼菲篮状菌感染患者的尿检测中存在交叉反应。血清中的类风湿因子，以及用兔抗胸腺球蛋白治疗过程中，可引起假阳性反应[31]。

MiraVista的抗原检测方法是应用和研究最广泛的，而其他研究组也有类似方法[94-95]。后者的研究组用商品化多克隆抗体，发现阳性和阴性标本均与MiraVista检测有很好的相关性，但也存在与芽生菌病、球孢子菌病和副球孢子菌病的交叉反应问题。虽然已生产出单克隆抗体，克服了特异性问题，但由于敏感性欠佳，未被进一步研发[96]。美国疾病预防和控制中心研发了一项检测尿中组织胞浆菌抗原的试验，主要在资源匮乏地区进行了评价；评价结果显示，其敏感性为81%，特异性为95%[97]。

目前已有商品化、来自IMMY(Norman，OK)的组织胞浆菌抗原检测方法(ALPHA Histoplasma EIA)，它被广泛用于不同的诊断服务提供者。该试验与MiraVist在检测尿标本时一致率为97.6%。在24份不一致标本中，5份在MiraVista检测为假阳性，另外10份在MiraVista为低于定量检测下限[98]。

一些工作人员建议，由于存在交叉反应问题，尿抗原检测不应作为一项单独的方法诊断组织胞浆菌病，而应与其他方法配合使用[31]。

(七)(1,3)-β-D-葡聚糖检测

(1,3)-β-D-葡聚糖为存在于多种真菌(包括曲霉、念珠菌、镰刀菌)细胞壁的多糖；但在隐球菌、芽生菌和毛霉中很少见或不存在。它见于侵袭性真菌感染患者的血液中，可激活鲎凝集途径中的G因子，从而进行检测和定量。目前已有几种商品化的试验方法[99]。Fungitell是目前应用最广

泛、唯一经 FDA 批准和 CE 认证的，由 Associates of Cape Cod（Associates of Cape Cod，Inc.，Falmouth，MA）生产[100]。该试剂盒利用来自鲎的凝血连锁反应进行检测。

该试验早期的研究设定临界值为 60 pg/ml[100]。然而在大型多中心研究中，临界值设定为 60 pg/ml 时的敏感性和特异性分别为 69.9％和 87.1％；设定为 80 pg/ml 时的敏感性和特异性分别为 64.4％和 92.4％[101]。生产商现在推荐＜60 pg/ml 为阴性，≥80 pg/ml 为阳性，两者之间为灰区（intermediate region）(http://www.acciusa.com)。

该试验的临床应用要强调几点重要特征。在一项研究中，β-D-葡聚糖水平在不同患者之间及同一患者不同次检测时有明显变化；当两个连续标本检测值均≥80 pg/ml 时具有最佳的敏感性、特异性和准确度，并且临床治疗有效不一定会使 β-D-葡聚糖水平下降[102]。一项大型的回顾性研究纳入了 80 例已确诊和 36 例可疑患有侵袭性真菌病的患者，发现系统性抗真菌治疗不会影响试验的敏感性。试验在侵袭性曲霉菌病中的敏感性比侵袭性念珠菌病高；然而在血液恶性肿瘤或干细胞移植的患者中，敏感性会降低[103]。患者每周检查 2 次时敏感性最佳[104]。β-D-葡聚糖假阳性结果可能由以下几个原因导致：①静脉注射免疫球蛋白或白蛋白[103]；②使用纤维素膜进行血液透析[103]；③使用含葡聚糖的纱布或拭子；④菌血症；⑤黏膜炎或移植物抗宿主病；⑥使用各种抗生素[105]。

最近的一项荟萃分析[106]纳入了各种 β-D-葡聚糖试验[包括 Fungitell、Glucatell（Associates of Cape Cod，Inc.）、Fungitec 试验（Seikagaku Corp，Tokyo，Japan）和 Wako BG 试验（Wako Pure Chemicals Co，Osaka，Japan）]。研究发现在 365 名已确诊侵袭性真菌病的患者中，β-D-葡聚糖试验的综合敏感性为 79.1％，综合（pooled）特异性为 87.7％，但不同研究的变异范围很大（敏感性 50％～100％，特异性 45％～100％）。有趣的是，研究发现在念珠菌病和曲霉菌 2 组患者中，敏感性没有差异，但这与一些单中心的研究结果相悖[103]。一项随后的荟萃分析在很大程度上证实了这些结果[107]。美国感染病学会关于曲霉菌病的指南目前推荐 β-D-葡聚糖试验用于诊断，但指出它对曲霉菌病不特异，欧洲临床微生物和感染病学会（European Society for Clinical Nicrobiology and Infectious Diseases，ESCMID）指南支持它用于诊断念珠菌血症、侵袭性念珠菌病和慢性播散性念珠菌病[108]。

虽然没有批准用于检测 BAL 样本，几项研究发现 β-D-葡聚糖试验用于血液肿瘤患者时，得到有希望的结果[109]，但用于实体器官移植受者时，得到失望的结果[110]。当使用临界值为 200 pg/ml 时，它也可用于预后判断，但这仍需要进一步评估[111]。

检测脑脊液样本中的 β-D-葡聚糖有助于诊断和监测嘴突脐孢（*Exserohilum rostratum*）引起的暴发性真菌性脑膜炎[112]。当临界值为 138 pg/ml 时，该试验的敏感性和特异性分别为 100％和 98％。大多数 β-D-葡聚糖水平下降的患者治疗后无症状；然而，在那些 β-D-葡聚糖水平仍然高的患者中，虽然这组患者数量很少，但结局很差。

β-D-葡聚糖也可用作耶氏肺孢子菌的诊断标志物，可用于 HIV 阳性和 HIV 阴性患者检测[113-114]。尽管有些研究使用了宽泛的不同临界值定义检测阳性(23.2 pg/ml[115]；100 pg/ml[114])，但在这种情况下检测的敏感性和特异性普遍很高，敏感性为 96.4％～100％，特异性为 87.8％～100％。最近欧洲白血病感染会议的指南推荐把 β-D-葡聚糖用于诊断工具，该检测呈阴性时，足以排除肺孢子菌感染，证据等级为 AⅡ[116]。在 HIV 患者肺孢子菌感染治疗成功后 β-D-葡聚糖水平未降低，因此该试验不能用于判断预后[115]。该试验用于诊断卡氏肺孢子菌感染的性能（诊断比值比为 102.3）优于诊断其他侵袭性真菌感染（诊断比值比为 25.7）[117]。最近的荟萃分析发现，该试验的敏感性和特异性在 HIV 阳性患者分别为 92％和 78％，在 HIV 阴性患者分别为 85％和 73％，阴性结果仅能用于在 HIV 阳性人群中排除疾病[118]。

由于在某些患者组有发生假阳性的风险，建议 β-D-葡聚糖检测阴性可用于排除诊断，而阳性结果应谨慎对待[119]。

四、真菌特异性代谢物的检测

很多真菌代谢物和真菌抗原可用于检测临床标本中的真菌，它们的应用价值已被评价。被评

估的代谢物包括 D-阿拉伯糖醇[120]、D-甘露醇[121]、D-阿拉伯糖醇与 L-阿拉伯糖醇的比值[122]、胶霉毒素[123]和 2-戊烷基呋喃[124]。血清中 D-阿拉伯糖醇与 L-阿拉伯糖醇的比值有助于在中性粒细胞减少症患者中发现念珠菌血症[19]，而 2-戊烷基呋喃有希望通过呼气试验诊断侵袭性曲霉菌病[125]。用质谱分析法来检测这些代谢物的能力，可以进行更大量的研究来评估它们的临床应用价值[126]，但目前这些试验尚无商品化的方法。

五、质谱分析法

基质辅助激光解吸电离飞行时间（matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight，MALDI-TOF）质谱越来越多地用于固体培养基传代后酵母菌和霉菌培养物的鉴定[127-128]。然而，该鉴定要求微生物生长在固体培养基上，会导致出结果的时间延长。因此，尚需要能直接从初始临床标本中鉴定真菌的方法。直接从血培养物中鉴定真菌是可行的，但血培养物中存在的蛋白质和血红蛋白会干扰产生的频谱，进而影响最终的鉴定结果[129]。尽管如此，有些研究组已经研发出直接检测的方法，但成功率不同[130-131]，有几项研究用模拟的血培养[132-133]，但明显与临床实践存在较大差异。最近一项大型的双中心研究纳入了 346 例血培养阳性的酵母菌，发现与常规基于培养的方法相比，直接用 MALDI-TOF 鉴定白念珠菌的准确率为 95.9%，非白念珠菌为 86.5%[134]。这表明血培养孵育后直接检测和鉴定多种念珠菌已经可行，在不久的将来可能成为标准的操作程序，但尚需在不同的患者群体中通过大规模的临床评估进行验证。

MALDI-TOF 鉴定霉菌比鉴定酵母菌更具挑战性，部分原因是霉菌菌落由不同的结构组成，包括菌丝、孢子、产孢结构，导致产生的谱图变异性较大。此外样本的制备更重要，并且商品化的数据库通常仅含数量有限的菌属。霉菌鉴定的正确率因所用系统不同而有差异，范围在 72%～100%[135]。霉菌的很多属，包括皮肤癣菌、曲霉（*Aspergillus*）、镰刀菌（*Fusarium*）、根霉（*Rhizopus*）、拟青霉（*Paecilomyces*）、各种暗色真菌和几种其他种的霉菌，可用 MALDI-TOF 鉴定，但它们通常需要实验室内自建数据库[136-137]。

六、核酸检测

自 20 世纪 90 年代早期，人们就已开始积极探索核酸检测用于诊断真菌感染和鉴定病原体。理论上，这种方法有很多优势，包括能检测出含量很少的微生物或不能培养的微生物，向自动化发展的潜力，避免了培养第 3 类/生物安全 3 级真菌的风险，减少了鉴定病原体的时间，以及在原始临床标本中可检测到真菌耐药性[138]。此外，核酸检测还使经福尔马林固定、甚至石蜡包埋的组织活检标本中病原体的检测成为可能。然而，对于最佳的标本处理方法、DNA 提取、靶序列设计、质量控制等问题，尽管最近有很多已报道的方法[139-141]，但尚未达成共识。敏感性和特异性变异相当大，对侵袭性曲霉菌病，敏感性和特异性分别为 58%～80%和 78%～95%[142]。对侵袭性念珠菌病，敏感性和特异性分别为 95%和 92%[143]。由于这种变异，美国感染病学会（IDSA）的曲霉菌病指南仅支持 PCR 与其他的诊断试验联合使用。

对侵袭性曲霉菌病，有来自“欧洲曲霉 PCR 发起组织（European Aspergillus PCR Initiative，EAPCRI）/国际人类与动物真菌学组织（International Society for Human and Animal Mycology，ISHAM）”工作组的推荐，针对诊断性 PCR 试验的不同部分定义了一套标准化建议，而不是针对 PCR 检测的标准化。他们报道了使用全血、血清、血浆作为诊断性试验样本时标准化的条件[144]。对念珠菌病，使用全血、rRNA 或 P450 多拷贝靶标和体外 PCR 检出限为≤10 菌落形成 U/ml，所有这些都与试验性能的提高有关[143]。

目前市场上已有很多商品化的 PCR 试剂盒用于诊断侵袭性曲霉菌病，包括由罗氏公司的 Septifast（Roche Diagnostics，Indianapolis，IN），其可检测几种念珠菌和烟曲霉，以及 Myconostica 公司的 MycAssay（Myconostica，Cambridge，United Kingdom）、Pathonostics 公司的 AsperGenius（Maastricht，The Netherlands）、Ademtech 公司的 MycoGENIE（Pessac，France）。这 4 种试剂盒是 CE 许可的。Septifast 已在中性粒细胞缺乏症患者[145]和非中性粒细胞缺乏症患者[146]中评估过，但结果令人失望。对念珠菌和曲霉，均有假阳性和假阴性结果。因此，Septifast 系统的敏感性

和特异性有限，对诊断真菌感染的前景欠佳。

曲霉菌属 MycAssay 检测也在多项研究中被评估，主要为重症监护病房(intensive care unit，ICU)患者[146-147]和高风险的血液病患者[148]。该试验用血清标本作为筛查试验，或用 BAL 标本作为诊断试验(http://www.myconostica.co.uk/aspergillus)。在血液病患者的敏感性为 50%～80%，特异性 90.5%～100%。作者总结认为，其检测性能与半乳甘露聚糖试验类似[148]。在 ICU 患者中，有报道称其敏感性更高，为 86.7%～100%，特异性为 87.6%～92.9%[147]，当检测多个标本时敏感性会升高[146]。在最近一项对照研究中，MycAssay 使用 BAL 标本诊断肺孢子菌的敏感性和特异性均为 100%[149]。

Pathonostics AsperGenius 试验用于 BAL 样本已被评估过，可在同一份样本中用于诊断侵袭性曲霉菌病和检测唑类药物的耐药性。与半乳甘露聚糖试验检测 BAL 相比，它的敏感性和特异性在血液病患者分别为 90%和 89%，在 ICU 患者分别为 80%和 93%[150]。尽管未在血清中验证过，发现它的敏感性和特异性也分别有 79%和 100%，表明使用侵袭性较小的样本而不是 BAL 时，也是有用的[151]。一项近期研究评估了它在血浆中的应用，同时用添加标准菌株的(spiked)样本和临床样本，仅有单一阳性结果即被认为有意义时，敏感性和特异性分别为 80%和 78%；当多个阳性样本才被认为有意义时，特异性为 100%，但敏感性只有 50%[152]。

另一项近期经过评估的曲霉 PCR 检测是 MycoGENIE 实时 PCR 试剂盒，它可用于诊断试验并同时检测唑类耐药，所用样本类型为血清或 BAL[153]。该试验的敏感性和特异性均相当高，在 BAL 样本分别为 93%和 90%，在血清分别为 100%和 85%，并检测出所有的耐药株。

检测念珠菌病最有前景的一项试验是 T2Candida test(T2Biosystems，Lexington，KY)，它可直接从全血样本中检测 5 种念珠菌属，而无需培养。与各种自动化血培养系统相比，以添加标准菌株的(spiked)血样本为参照，它有很好的敏感性和特异性，并缩短了阳性报警时间[154]。其他商品化的试验包括 Prove-it Sepsis(Mobidiag，Espoo，Finland)和 Luminex(Chicago，IL)，它们从血培养中检测/鉴定真菌，SeptiTest(Molzym，Bremen，Germany)、Vyoo(Analytik Jena，Jena，Germany)、Plex-ID(Omnica，Irvine，CA)、Magicplex(Seegene，Seoul，Korea)、Iridica(Abbott，Maidenhead，United Kingdom)，这些试验可从血样本直接检测/鉴定真菌。

ESCMID 关于念珠菌病的指南不支持用 PCR 诊断念珠菌病，很大程度上是因为试验缺乏标准化，并且没有大规模的临床验证[108]。随着新试验的开发和更大规模的验证，这种情况会改变。同样，将来欧洲癌症研究和治疗组织(European Organization for Research and Treatment of Concer，EORTC)对侵袭性真菌病的定义会包括阳性 PCR 结果作为诊断的“真菌学的因素”，这仍然是值得期待的。

核酸技术用于检测其他真菌感染目前大多仍处于研究阶段；它们在有可能应用于临床之前，还需要进一步的发展和验证。

参考文献请扫二维码查阅

第16篇

真菌学

第120章　念珠菌属、隐球菌属及其他医学上重要的酵母菌*

ANDREW M. BORMAN, ELIZABETH M. JOHNSON

（吴文娟　译；陈中举、陆玲　审校）

传统酵母菌是指通过出芽分裂的单细胞真菌。酵母菌并非一种正式的分类学名词，而是一种生长形式，是一大类遗传背景无关的真菌，包括从外瓶霉属（*Exophiala*）的黑酵母到双相真菌组织胞浆菌（*Histoplasma*）、芽生菌属（*Blastomyces*）、副球孢子菌属（*Paracoccidioides*）、篮状菌属（*Talaromyces*）和 *Emergomyces* 等的酵母形式[1-2]。本章所讨论的酵母菌属通常归属于子囊菌门或担子菌门，但不包括 Ajellomycetaceae 科和篮状菌属的双相真菌。

一、分类和命名

酵母菌分类学在不断发展。分子鉴定策略的迅速广泛使用已被允许用于详细的系统发育分析（第116章），从而可以更准确地划定分类学界限，并对许多酵母物种和属进行重新分类。许多传统念珠菌分类中的"隐型种"或"菌种复合群"只能通过DNA序列分析进行区别，因此分子鉴定方法进一步增加了分类学的复杂性。阿姆斯特丹宣言（Amsterdam Declaration）[3]也将带来其他分类上的变化，该宣言提议对命名法典第59条进行重大修改，放弃了给予同一种真菌的无性期和有性期不同名称的做法。从2013年起，一种真菌必须只有单一的名称，由真菌命名委员会（Nomenclature Committee for Fungi）[4]做出或批准保留哪一个名称的决定。早先的有性型名称优先的传统认识可能令医学真菌学家困惑，因为通常实验室中分离出的是无性型。但是，该法则进行了补充修改："选择要采用的通用名称时，遵循发表优先顺序的原则"。似乎终止了有性型名称优先于无性型名称的习惯。需要注意的是，"通用名称应众所周知"。目前，在国际真菌分类学委员会和真菌命名委员会的主持下成立的工作组和委员会正在努力提出关键菌属的保留（受保护）和剔除的名称清单，以最终批准的为有效。当然，需要结合临床的意见来确定要保留的名称（参考文献[5]和[6]中有更详细的讨论）。

因此，尽管 Kurtzman、Robnett[7]和 Fell 等[8]以前分别提供了关于子囊菌酵母和担子菌酵母之间系统发育关系的概述，在未来几年中可能会对分类学进行重大修订，基于多基因位点序列鉴定进行生物分类学定义。在这方面，应当指出，对于将两个真菌分离株视为相同或不同物种所必需的DNA序列一致性程度的统一规则，还远远没有建立。考虑到这些不确定性，谨慎地使用有性型和无性型名称可能是明智的。当前有效的无性型和有性型名称列表可在 www. mycobank. org 网站上找到。表120-1中总结了本章中讨论的关键致病性酵母菌种。最近对酵母菌的分类学变化也进行了综述[6]。

（一）子囊菌类酵母（Ascomycetous Yeasts）

1. 念珠菌属（Genus *Candida*）　念珠菌属目前归属于子囊菌纲的酵母菌目，大约包含200个不同的种，但显然并不完善，因为"*Candida*"种至少包含13个有性型属。由于最终分类法的不确定性，本章使用该属成员的无性型名称，并在括号中显示有性型名称（已知的）。

---

*本章包含 Susan A. Howell、Kevin C. Hazen 和 Mary E. Brandt 在本手册第11版第117章中呈现的部分内容

表 120-1 无性型/有性型和主要致病酵母菌的曾用名对照表

无性型	曾用名	有性型
Apiotrichum asahii	阿萨西毛孢子菌	无
Apiotrichum loubieri	*Trichosporon loubieri*	无
Apiotrichum mycotoxinivorans	*Trichosporon mycotoxinivorans*	无
白念珠菌	*Oidium albicans*,*Monilia albicans*	无
耳念珠菌	无	无
布拉加念珠菌	无	*Nakaseomyces bracarensis*
链状念珠菌	*Candida brumptii*	*Diutina catenulata*
西弗念珠菌	西弗射盾子囊霉	西弗毛滴虫
无名念珠菌	*Torulopsis candida*	汉森德巴利酵母菌
发酵念珠菌	*Torula fermentati*	加勒比麦尔酵母菌
光滑念珠菌	光滑隐球菌	*Nakaseomyces glabrata*
季也蒙念珠菌	季也蒙毕赤酵母	季也蒙麦尔酵母菌
平常念珠菌	*Torulopsis inconspicua*	*Pichia cactophila*
乳酒念珠菌	假热带念珠菌、马其顿念珠菌	马克思克鲁维酵母
克柔念珠菌	东方伊萨酵母	库德里阿兹威毕赤酵母
解脂念珠菌	*Mycotorula lipolytica*	解脂耶氏酵母
葡萄牙念珠菌	钝圆念珠菌,近平滑念珠菌钝圆变种	葡萄牙棒孢酵母
尼瓦利亚念珠菌	无	*Nakaseomyces nivariensis*
挪威念珠菌	*Candida mycoderma var. annulata*	挪威毕赤酵母
皮托念珠菌	*Candida slooffiae*,*Torulopsis pintolopesii*	*Kazachstania pintolopesii*
Candida pelliculosa(菌膜念珠菌)	异常汉逊酵母,异常毕赤酵母	异常威克汉姆酵母菌
铁红念珠菌	*Torula pulcherrima*	*Metschnikowia pulcherrima*
Candida robusta	超过 100	酿酒酵母
皱褶念珠菌	*Mycoderma rugose*,*Torula rugosa*	*Diutina rugosa*
产朊念珠菌	*Torulopsis utilis*, *Pichia jadinii*, *Hansenual jadinii*, *Lindnera jadinii*	*Cyberlindnera jadinii*
涎沫念珠菌	*Monilia zelanoides*	无
Cutaneotrichosporon cutaneum	皮肤毛孢子菌	无
Cutaneotrichosporon dermatis	真皮毛孢子菌	无
Cutaneotrichosporon mucoides	黏液毛孢子菌	无
头状芽生裂殖菌	头状地霉、头状毛孢子菌、头状双足囊菌、头状芽生裂殖菌	头状大孢酵母菌
小红酵母	*Torula minuta*	*Cystobasidium minuta*
斯洛菲红酵母	无	*Cystobasidium slooffiae*

(1)白念珠菌复合群(*Candida albicans* Species Complex):白念珠菌复合群包括白念珠菌(*C. albicans*),都柏林念珠菌(*Candida dubliniensis*)和非洲念珠菌(*Candida africana*)。就毒力和流行病学而言,白念珠菌是复合群中最重要的病原体,仍然是该属中的主要病原体[9-13]。都柏林念珠菌与白念珠菌在许多表型和基因型上具有相似性,但在几种体内模型中表现出降低的毒力[14-15]。非洲念珠菌是芽管阳性,厚垣孢子阴性的酵母菌,与白念珠菌特性非常相似[16],但是似乎只限于人类的女性生殖道[15],并且在体内的毒力弱于白念珠菌和都柏林念珠菌[15]。

(2)非白念珠菌(Non-*C. albicans* Species):根据最近的流行病学调查,8～10 种非白念珠菌种在临床环境中常见[9-12],其中一些较常见的菌种被认为是菌种复合群。现认为近平滑念珠菌(*Candida parapsilosis*)复合群包含 3 个菌种,即近平滑念珠菌、拟平滑念珠菌(*C. Orthopsilosis*)和似平滑念珠菌(*C. Metapsilosis*)[17]。最近的有性型名称麦尔酵母菌属(*Meyerozyma*)包括季也蒙念珠菌

(*Candida guillermondii*)[有性型季也蒙麦尔酵母菌(*Meyerozyma guilliermondii*)]和发酵念珠菌(*Candida fermentati*)[有性型加勒比麦尔酵母菌(*Meyerozyma caribbica*)][18-19]。光滑念珠菌(*Candida glabrata*)复合群(有性型 *Nakaseomyces*)包括光滑念珠菌及关系密切但表型不同的布拉加念珠菌(*Candida bracarensis*)和尼瓦利亚念珠菌(*C. nivariensis*)[20]。皱褶念珠菌(*Candida rugosa*)复合群(有性型 Diutina)包括皱褶念珠菌、伪皱念珠菌(*C. pseudorugosa*)、近皱褶念珠菌(*C. pararugosa*)和新皱褶念珠菌(*C. neorugosa*)[21]。链状念珠菌(*Candida catenulata*)也具有 *Diutina* 有性期。对于热带念珠菌,至今既无有性型也无隐种的记载[6]。

大量其他念珠菌种类很少在医疗环境中遇到,在使用DNA测序研究作为分类方法后,其中很多菌种的有性型名称被更多报道。包括挪威念珠菌(*Candida norvegensis*)[挪威毕赤酵母(*Pichia norvegensis*)]、平常念珠菌(*Candida inconspicua*)(*Pichia cactophila*)、西弗念珠菌(*Candida ciferri*)(*Trichomonoascus ciferrii*)、无名念珠菌(*Candida famata*)[汉森德巴利酵母菌(*Debaryomyces hansenii*)]、季也蒙念珠菌璞膜变种(*Candida guilliermondii* var. *membranifaciens*)[奥默柯达菌(*Kodamaea ohmeri*)]、乳酒念珠菌(*Candida kefyr*)[马克思克鲁维酵母(*Kluyveromyces marxianus*)]、克柔念珠菌(*Candida krusei*)[库德里阿兹威毕赤酵母(*Pichia kudriavzevii*)]、解脂念珠菌(*Candida lipolytica*)[解脂耶氏酵母(*Yarrowia lipolytica*)]、葡萄牙念珠菌(*Candida lusitaniae*)[葡萄牙棒孢酵母(*Clavispora lusitaniae*)]、菌膜念珠菌(*Candida pelliculosa*)[异常威克汉姆酵母菌(*Wickerhamomyces anomalus*)]和产朊念珠菌(*Candida utilis*)(*Cyberlindnera jadinii*)。涎沫念珠菌(*C. zeylanoides*)还没有已知的有性型名称。

少数物种包括阿赛念珠菌(*Candida aaseri*)和伪阿赛念珠菌(*C. pseudoaaseri*)主要是从单个病例报道得知的,它们在遗传上具有较近的关系[22]。苏巴斯念珠菌(*Candida subhashii*)与近平滑念珠菌复合体、热带念珠菌,白念珠菌和都柏林念珠菌在遗传上关系密切[23],突尼斯念珠菌(*CandidaTunisiensis*)和 *Hanseniaspora opuntiae* 也是最近在突尼斯医院临床分离株中鉴定的[24]。迄今为止很少见的希木龙念珠菌(*Candida haemulonii*)复合群特别引人注目,包括希木龙念珠菌、假希木龙念珠菌(*Candida pseudohaemulonii*),*Candida duobushaemulonii* 和特别的耳念珠菌(*Candida auris*)。该菌最初于2009年报道与外耳炎[25]相关,具有多重耐药性和高致病性的耳念珠菌同时在三大洲作为重要的医院病原体出现,有高水平的院内和院外传播证据[13,26-27]和独特的、具有地理限制的克隆系[26-28]。

2. 酵母属(*Genus Saccharomyces*) 虽然酿酒工业花了大量的心血研究酵母属的分类,但是唯一在医学上具有重要意义的种是酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)。

3. *Saprochaete* 属(Genus *Saprochaete*) *Saprochaete capitata* 是 *Blastoschizomyces capitatus*[29]的当前有效名称,该名称是从过时的分类单元 *Blastoschizomyces pseudotrichosporon* 和 *Trichosporon capitatum*[30]组合而来。有性型名称是 *Magnusiomyces capitatus*[29]。这种真菌的旧名称是 *Geotrichum capitatum*,*Trichosporon capitatum*(无性型)和 *Dipodascus capitatus*(有性型)。虽然 *Saprochaete* 属包含至少12个物种,但在临床环境中遇到的主要物种是 *S. capitata*。

(二)担子菌类酵母菌(*Basidiomycetous Yeasts*)

1. 隐球菌属(Genus *Cryptococcus*) 目前,在新型隐球菌(*Cryptococcus neoformans*)和格特隐球菌(*C. gattii*)中已发现5个不同的血清型。血清型A被认定为新型隐球菌格鲁比变种(*Cryptococcus neoformans* var. *grubii*)所特有,具有血清型D的通常判断为新型隐球菌新生变种。具有A/D血清型的可以认为是新型隐球菌格鲁比变种和新型隐球菌新生变种间菌株杂交的结果。血清型B和C被认为是格特隐球菌所特有的。血清型A和D能够产生有性型的新型线黑粉菌(*Filobasidiella neoformans*),血清型B和C产生的有性型菌种是杆孢线黑粉菌(*Filobasidiella bacillispora*)。最近的大量进化研究建议将原先命名的新型隐球菌和格特隐球菌重新组织其种复合群[31]。以前的新型隐球菌格鲁比变种名称保留为新型隐球菌,*Cryptococcusdeneoformans* 包含血清型D

分离株(以前的新型隐球菌新生变种);在格特隐球菌种复合群中至少识别出5个隐种,即格特隐球菌、*Cryptococcusdeuterogattii*、*Cryptococcus tetragattii*、*Cryptococcus decagattii* 和 *Cryptococcus bacillisporus*。尽管这些新建立的物种的流行率、致病性、药物敏感性不同,且在最近的分子分析中被表示为不同的种系[31-32],也有争议认为,这样的研究显示在仅有的7个物种中包含更多的遗传多样性,7个物种的提议尚不成熟[33]。

不断增加的非新型隐球菌(non-*C. neoformans*)偶尔可能成为人类感染的病原体,包括阿德利隐球菌(*C. adeliensis*)、白色隐球菌(*C. albidus*)、弯曲隐球菌(*C. curvatus*)、*Cryptococcus diffluens*、浅黄隐球菌(*C. flavescens*)、黄色隐球菌(*C. luteolus*)、罗伦隐球菌(*C. laurentii*)、*Cryptococcus liquefaciens*、地生隐球菌(*C. terreus*)和单咽隐球菌(*C. uniguttulatus*)、有性型单咽丝黑粉菌(*Filobasidium uniguttulatum*)。其中一些菌种最近被重新划分到限球壳属(*Tremellomycete genera*),包括 *Naganishia*[阿德利隐球菌(*C. adeliensis*)、白色隐球菌(*C. albidus*)、*C. diffluens* 和 *C. liquefaciens*]、*Hannaella*[黄色隐球菌(*C. luteolus*)]、*Solicoccozyma*[地生隐球菌(*C. terreus*)]和 *Papiliotrema*[罗伦隐球菌(*C. laurentii*)和浅黄隐球菌(*C. flavescens*)][34]。

2. 马拉色菌属(Genus *Malassezia*) 目前从人类和动物皮肤上已分离到15种马拉色菌。这些菌种在临床实验室非常常见,包括糠秕马拉色菌(*M. furfur*)、球形马拉色菌(*M. globosa*)、斯鲁菲亚马拉色菌(*Malassezia slooffiae*)、合轴马拉色菌(*M. sympodialis*)和钝圆马拉色菌(*M. obtusa*)和厚皮马拉色菌(*M. pachydermatis*)[35-36]。马拉色菌属是隶属于黑粉菌亚门(subphylum Ustilaginomycotina)(马拉色菌纲)的一种担子菌类酵母,许多菌种具有亲脂性,DNA测序是最可靠的菌种鉴定方法[35]。

3. *Pseudozyma* 属 目前,至少分离了20种Pseudozyma,且大部分来自环境中。这一类菌种被分在黑粉菌科(Ustilaginaceae)。但是,现在该菌属已经过时了,*Pseudozyma prolifica* 等同于 *Ustilago maydis*[36]。引起人类疾病的主要病原菌是 *Pseudozyma aphidis*、*Pseudozyma antarctica* 和 *Pseudozyma parantarctica*,它们最近被转入了有性型 *Moesziomyces* 属,而 *Pseudozymathailandica* 与 *Macalpinomyces* 属菌种的亲缘关系更近[36]。

4. 红酵母属(Genus *Rhodotorula*) 虽然在Mycobank数据库中列出了60多种红酵母,但已有的红酵母属明显是多系的[37]。临床相关的主要菌种有胶红酵母(*Rhodotorula mucilaginosa*)、小红酵母(*R. minuta*)和黏红酵母(*R. glutinis*)、*Rhodotorula slooffiae*、*Rhodotorula dairenensis*。小红酵母和 *R. slooffiae* 已经被重新分类到Cystobasidium属,胶红酵母、黏红酵母和 *R. dairenensis* 仍然保留在红酵母属[37]。

5. 掷孢酵母属(Genus *Sporobolomyces*) 掷孢酵母属是环境中存在的担子菌类酵母,现认为该菌属也是多系的[37]。在人类感染中曾分离到3种类型:红掷孢酵母(*S. roseus*)、荷斯坦掷孢酵母(*S. holsaticus*)和赭色掷孢酵母(*S. salmonicolor*),后2种分别具有有性型的约氏掷孢酵母(*S. johnsonii*)(同宗配合)和赭色掷孢酵母(*S. salmonicolor*)(异宗配合)。除了这3种仍然保留在掷孢酵母属,其他以前被归为掷孢酵母属的物种已经被重新分配到其他10多个不同的担子菌属[37]。

6. 毛孢子菌属(Genus *Trichosporon*) 虽然本书的上一版中描述了Mycobank数据库中的37个有效的种名,现在知道该菌属也有多系性[34]。已知与人类感染相关的有:阿萨西毛孢子菌(*T. asahii*)、类星形毛孢子菌(*T. asteroides*)、皮肤毛孢子菌(*T. cutaneum*)、真皮毛孢子菌(*T. dermatis*)、皮瘤毛孢子菌(*T. inkin*)、耶氏毛孢子菌(*T. jirovecii*)、*T. loubieri*、黏液毛孢子菌(*T. mucoides*)、解毒毛孢子菌(*T. mycotoxinivorans*)和卵形毛孢子菌(*T. ovoides*)[38]。阿萨希毛孢子菌、类星形毛孢子菌和卵形毛孢子菌保留在毛孢子菌属中。*T. loubieri* 和 *T. mycotoxinivorans* 已被重新归类为Apiotrichum,皮肤毛孢子菌、黏液毛孢子菌、真皮毛孢子菌和耶氏毛孢子菌属于新属 *Cutaneotrichosporon*[34]。

二、菌种的描述

1998年出版的一本关于酵母菌分类的重要专著列出了大约700种酵母菌[39]。然而,一项对肠

道菌群的研究发现了200多种新物种，这一惊人发现表明，酵母菌的真实数量可能要多得多[40]，2011年的同类专著描述了1500多种物种[41]。实际上，2017年11月进行了一次简单的PubMed搜索，搜索词为“yeast sp. nov”就检索到220多种新物种，主要是2015年以来描述的环境来源菌种(个人观察)。由于形态学在预测酵母菌的系统发育关系和鉴定上表现较差[31,34,36-38]，所以对所有病原的详细描述超出了单个章节的范围。在这里，描述了致病性酵母各属的一般特征，仅特别提到了在属水平鉴别菌株时有用的特征。

许多种类的酵母在真菌培养基上生长24 h就可被检测到，然而菌落通常在48～72 h内可见颜色从白色到奶油色或棕褐色。酵母菌的培养菌落湿润、光洁，乳酪状或膜质质地，一些可以产生荚膜形成黏液性菌落。大多数情况下不会产生气生菌丝。酵母菌的菌落可能透明或颜色鲜艳，或由于存在黑色素而变成黑色。后者属于暗色真菌，属于散囊菌纲(Eurotiomycetes)，在第127章有相关讨论。双相真菌病原体在组织中具有酵母相，该内容在第125章讨论。

一般来说，酵母菌是单细胞的真核生物，细胞出芽生殖，一般为圆形或椭圆形，有时形状细长或不规则。它们通过芽生孢子的方式繁殖，因此具有重要临床意义的酵母菌多是由一个祖细胞连接一个或多个子代细胞组成。当芽生孢子以线性的方式产生，而不是分裂，就会形成一个假菌丝的结构。在某种特殊环境下，如氧分压较低，一些酵母菌可以产生真正的分隔菌丝。而少数也产生大的、难辨的休眠孢子，称为厚垣孢子(chlamydospores)。

(一)子囊菌类酵母(Ascomycetous Yeasts)

1. 念珠菌属及其有性型(Genus *Candida* and Its Teleomorphs) 念珠菌的芽生孢子形态各异，从圆形到椭圆形到伸长。偶尔的初始分离物，特别是来自接受抗菌药物的患者，可能是高度多形性的。无性繁殖是通过多边出芽进行的，可能存在真正的菌丝。有几种念珠菌属为二倍体，最明显的是白念珠菌[42]。假菌丝和芽生孢子黏附的形态是鉴别念珠菌属的重要特征。图120-1揭示了这些形态学特征及其他临床常见菌种的特征。发现芽管和厚垣孢子有助于鉴别白念珠菌。

大多数念珠菌在25～30℃的温度下生长良好，许多在37℃或更高的温度下生长。菌落呈奶油状，会随着菌龄增加呈现更多的膜和分隔。一般来说，菌落呈白色到奶油色或黄褐色的，尽管有报道光滑念珠菌的红色菌落变异株，可能会与红酵母属相混淆[43]。大多数分离到的白念珠菌菌落在血平板上呈“伪足”(菌落边缘向外短小延伸)，25%的热带念珠菌和克柔念珠菌可以观察到该现象[44]，而其他种类念珠菌很少出现。最常见的致病性念珠菌的主要生理特性列于表120-2。

2. 酵母属(Genus *Saccharomyces*) 酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)是临床实验室分离的最常见菌种。多边出芽的酵母细胞呈圆形或椭圆形，可形成短的未成熟的(有时发育良好)假菌丝(图120-1)。其他生理特性列于表120-2。酿酒酵母同化棉子糖的反应是非常明显的。临床实验室中遇到的酵母菌很少能够利用碳源。

3. *Saprochaete* 属 菌落形态：光滑，边缘呈放射状，白色至奶油色，有光泽。显微镜下可见菌株形成真菌丝、假菌丝和似关节分生孢子的环状分生孢子。单从形态特征上，很难将*S. capitata*与毛孢子菌属和毛孢子菌属区分，需要进行生理学试验。*S. capitata*为非发酵、可在沙保弱葡萄糖琼脂45℃生长，在含放线菌酮琼脂室温下生长，不能水解尿素等特性可与毛孢子菌属鉴别。

(二)担子菌类酵母(Basidiomycetous Yeasts)

1. 隐球菌属(Genus *Cryptococcus*) 隐球菌是圆形、有时是椭圆形的酵母样真菌，形态变异很大，直径为3.5～8.0 μm或更大。单极出芽，在母体和子细胞之间有缩窄的颈(图120-3)。偶尔能看到大的酵母细胞(达到60 μm)，而且这种形状与孵育温度较高有关[45]。有时能看到多个芽。细胞壁非常脆弱，经常能见到破裂或新月形的细胞，尤其是在染色的组织切片中。真菌细胞的多糖荚膜(galactoxylomannan)的厚度变异很大，有的很宽，有的几乎检测不到。围绕细胞的“透明带”取决于菌株本身和使用的培养基。由于荚膜物质的存在，典型的菌落为黏液状，随着菌龄增长变得干燥或灰暗，颜色(奶油色、黄褐色、粉色、黄色)可能随着菌龄变化加深。具有很薄荚膜的菌株可能会

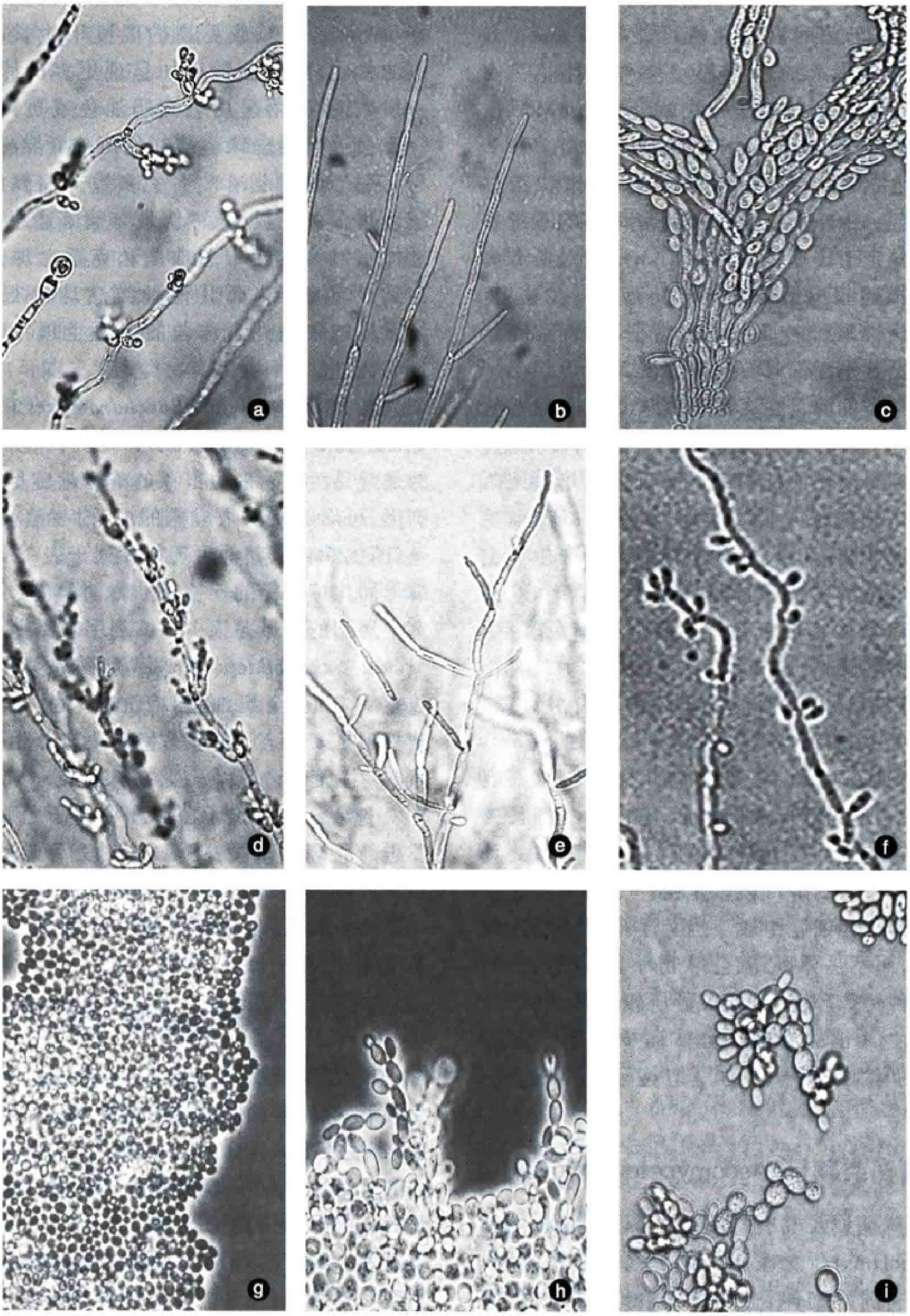


图 120-1 一些常见的病原性酵母菌在玉米粉琼脂培养基、环境温度下培养 24～48 h 的形态特征

注：a. 白念珠菌：芽生孢子，厚垣孢子，真菌丝和假菌丝；b. 克柔念珠菌：极细长，很少分枝的假菌丝形成 45°，少量芽生孢子；c. 乳酒念珠菌：大量的拉长的假菌丝和芽生孢子在一个典型的"堵塞"中产生；d. 葡萄牙念珠菌：短小、明显弯曲的假菌丝，在隔膜上、偶尔在隔膜间生成孢子；e. 近平滑念珠菌：细长、微弯的假菌丝，在接近 90°形成分支，在隔膜上生成孢子；f. 热带念珠菌：在隔膜上和隔膜间形成芽生孢子；g. 光滑念珠菌：无真菌丝或假菌丝；只有小的椭圆形出芽细胞；h. 酿酒酵母：大的卵形到伸长的芽生孢子，有时排列为发育不良的假菌丝；i. 红酵母属：大的圆形到椭圆形的芽生孢子，偶尔呈短链。放大倍数，×400（照片由 Adrien Szekely 提供），见彩插

表 120-2 分离自临床样本常见酵母菌的培养和生化特征[a]

种名	37℃生长	肉汤中的菌膜	假/真菌丝	厚垣孢子	芽管试验	荚膜*印度墨汁	同化												发酵						尿素	硝酸钾的利用	苯酚氧化酶	子囊孢子
							葡萄糖	麦芽糖	蔗糖	乳糖	甘露糖	蜜二糖	纤维二塘	肌醇	木糖	棉子糖	海藻糖	半乳糖醇	葡萄糖	麦芽糖	蔗糖	乳糖	甘露糖	海藻糖				
念珠菌和相关属																												
白念珠菌	+	−	+	+[b]	+	−	+	+	V	−	+	−	−	−	+	−	+	−	F	F	−	−	F	F	−	−	−	−
耳念珠菌	+	−	V	−	−	−	+	+	+	−	−	+	−	−	−	+	+	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	−
链状念珠菌	V	−	+	−	−	−	+	+	−	−	+	−	−	−	+	−	−	−	F*	−	−	−	−	−	−	−	−	−
都柏林念珠菌	+	−	+	+[b]	+	−	+	+	+	−	+	−	−	−	V	−	+	−	F	F	−	−	F	F	−	−	−	−
无名念珠菌	+	−	−	−	−	−	+	+	+	V	+	+	+	−	+	+	+	V	W	−	W	−	−	W	−	−	−	V
光滑念珠菌	+	−	−	−	−	−	+	+	−	−	−	−	−	−	−	−	+	−	F	−	−	−	−	F	−	−	−	−
季也蒙念珠菌	+	−	+	−	−	−	+	+	+	−	+	+	+	−	+	+	+	+	F	−	F	−	F*	F	−	−	−	V
乳酒念珠菌	+	−	+	−	−	−	+	−	+	+	+	−	V	−	V	+	V	−	F	−	F	F*	F	−	−	−	−	−
克柔念珠菌[c]	+	+	+	−	−	−	+	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	F	−	−	−	−	−	V	−	−	V
郎比可念珠菌	V	+	+	−	−	−	+	−	−	−	−	−	−	−	+	−	−	−	F	−	−	−	−	−	−	−	−	V
解脂念珠菌[c]	+	+	+	−	−	−	+	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	+	−	−	V
葡萄牙念珠菌[d]	+	−	+	−	−	−	+	+	+	−	+	−	+	−	+	−	+	−	F	−	F	−	F	F	−	−	−	V
近平滑念珠菌[e]	+	−	+	−	−	−	+	+	+	−	+	−	−	−	+	−	+	−	F	−	−	−	−	−	−	−	−	−
pelliculosa 念珠菌	V	−	−	−	−	−	+	+	+	−	+	−	+	−	+	−	+	−	F	F*	F	−	F	−	−	+	−	+
皮托念珠菌[f]	+	−	−	−	−	−	+	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	F	−	−	−	−	−	−	−
皱褶念珠菌	+	−	+	−	−	−	+	−	−	−	+	−	−	−	V	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
热带念珠菌[d,e]	+	+	+	−[g]	−	−	+	+	+	−	+	−	+	−	+	−	+	−	F	F	F	−	F*	F*	−	−	−	−
涎沫念珠菌	−	V	+	−	−	−	+	−	−	−	V	−	V	−	−	−	+	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
隐球菌和相关属																												
新型隐球菌	+	−	R	−	−	+	+	+	+	−	+	−	+	+	+	V	+	+	−	−	−	−	−	−	+	−	+	−
单咽丝黑粉菌	−	−	−	−	−	+	+	+	+	−	V	−	V	+	+	V	V	−	−	−	−	−	−	−	+	−	−	−

（续 表）

种名	37℃生长	肉汤中的菌膜	假/真菌丝	厚垣孢子	芽管试验	荚膜,印度墨汁	同化												发酵						尿素	硝酸钾的利用	苯酚氧化酶	子囊孢子
							葡萄糖	麦芽糖	蔗糖	乳糖	甘露糖	蜜二糖	纤维二塘	肌醇	木糖	棉子糖	海藻糖	半乳糖醇	葡萄糖	麦芽糖	蔗糖	乳糖	甘露糖	海藻糖				
Hannaella luteola	−	−	−	−	−	+	+	+	+	−	+	+	+	+	+	+	+	+	−	−	−	−	−	−	+	−	−	−
Naganishia albida	V	−	−	−	−	+	+	+	+	V	V	+	+	+	+	+	+	V	−	−	−	−	−	−	+	+	−	−
Papiliotrema laurentii	V	−	−	−	−	+	+	+	+	+	+	V	+	+	+	V	+	+	−	−	−	−	−	−	+	−	−	−
Solicoccozyma terrea	V	−	−	−	−	+	+	V	−	V	V	−		+	+	+	+	V	−	−	−	−	−	−	+	+	−	−
毛孢子菌和相关属																												
黏液毛孢子菌	+		+	−	−	−	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	−	−	−	−	−	−	+	−	−	−
阿萨西毛孢子菌	+		+	−	−	−	+	+	V	+	+	−	+	V	V	−	V	−	−	−	−	−	−	−	+	+	−	−
卵形毛孢子菌	V		+	−	−	−	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	−	−	−	−	−	−	−	+	−	−	−
其他																												
念珠状地丝菌[h]	V	+	+	−	−	−	+	−	−	−	+	−	−	−	+	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
威克汉姆无绿藻[h]	+	−	−	−	−	−	+	−	−	−	+	−	−	−	−	−	+	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
黏红酵母	+	−	−	−	−	V	+	+	+	−	V	−	+	−	+	+	+	−	−	−	−	−	−	−	+	+	−	−
赤红酵母	+	−	−	−	−	V	+	+	+	−	+	−	V	−	+	+	+	−	−	−	−	−	−	−	+	−	−	−
酿酒酵母	+	−	V	−	−	−	+	+	+	−	+	−	−	−	−	+	V	−	F	F	F	−	F	F*	−	−	−	+
头状芽生裂殖菌	+	+	+	−	−	−	+	−	−	−	+	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
赭色掷孢酵母	V	+	V	−	−	−	+	+	+	−	V	−	+	−	W	−	+	−	−	−	−	−	−	−	+	+	−	−

注：[a] 根据参考文献[168]及其参考文献进行修订。+. 生长明显高于阴性对照；−. 阴性反应；V. 不同菌株具有不确定性．*. 有些菌可为相反的反应结果；R. 罕见的；F. 糖发酵(如产气)；W. 弱反应。[b] 白念珠菌通常产生单个和不超过 2 个末端厚垣孢子，有些都柏林念珠菌会产生成对的、三个或成簇的末端厚垣孢子。可参考关于白念珠菌和都柏林念珠菌附加试验的章节。[c] 解脂念珠菌同化赤藓糖醇；克柔念珠菌不能同化赤藓糖醇；克柔念珠菌最高生长温度为 43～45℃，解脂念珠菌最高生长温度为 33～37℃。[d] 葡萄牙念珠菌同化鼠李糖；热带念珠菌通常不会同化鼠李糖。[e] 近平滑念珠菌同化 L-阿拉伯糖；热带念珠菌不能同化 L-阿拉伯糖。[f] 皮托念珠菌是能够在 40～42℃生长的耐高温酵母菌。[g] 热带念珠菌少见菌株能够产生泪滴状的厚垣孢子。[h] 不是酵母菌，但是可能与几种酵母菌相混淆

出现与念珠菌相似的菌落。刀豆氨酸-甘氨酸-溴麝香草酚蓝琼脂(canavanine-glycine-bromthymol blue)被推荐用于区分血清型 A、D 与血清型 B、C[46-47]。但是,标准的实验室生化试验并不能完全区分新型隐球菌和 *C. deneoformans* 或格特隐球菌复合群的 5 个种[31]。

2. 马拉色菌属(Genus *Malassezia*) 该属内大部分种的生长需要脂质,只有厚皮马拉色菌(*M. pachydermatis*)的生长不需要依赖培养基中补充脂质。Van Abbe [48]、Leeming 和 Notman [49]研制出了适合马拉色菌种属中所有菌株生长的培养基(第 118 章)。虽然这些培养基还没有商品化,但是含有数滴无菌橄榄油的选择性沙氏葡萄糖琼脂已经在使用,一些对营养要求比较高的菌株在这种培养基上依然不能生长[50]。对于慢生长的菌株来说,接种的培养基应该在 32～35℃需氧条件下,相对潮湿的环境培养 2 周。菌落呈奶油色到米色,光滑或者皱褶,质地脆弱,通常很难将菌落制成悬浮液。马拉色菌属在显微镜下与其他酵母菌的区别在于,能够形成突出的单极芽痕或囊领,这是因为不断在这一位点形成子代细胞的结果(图 120-2b)。

这些结构在光滑念珠菌中不存在。但由于光滑念珠菌个体较小,具有典型的单极出芽,可能会与马拉色菌属相混淆(图 120-1g)。合轴马拉色菌(*M. sympodialis*)和日本马拉色菌(*M. japonica*)培养后可观察到合轴芽生结构。这个种属具有球形、椭圆形或细长形等多种形态,具有厚的细胞壁,长度范围为 1.5～8.0 μm。

3. *Pseudozyma* 属 *Pseudozyma* 属真菌属于担子菌类,是一类植物病原菌,通常会在环境中被发现。菌落形态通常是湿润的、米黄色到棕褐色、在普通培养基生长呈现皱缩样。*P. aphidis* 在念珠菌显色培养基(CHROMagar Candida)上 37℃培养 48 h 后呈现粗糙的绿色菌落。在含有放线菌酮的培养基上,该菌的生长会被抑制。在显微镜下观察会发现纺锤状、梭状的孢子形态。

4. 红酵母属(Genus *Rhodotorula*) 红酵母属及其近缘属 *Cystobasidium* 菌种[37]都与隐球菌具有较为相似的生理特性和形态学特征。它们都为具有荚膜的圆形到椭圆形多边出芽的酵母(图 120-1i),带有荚膜,尽管荚膜通常很小。与隐球菌不同的是,红酵母属能产生明显的类胡萝卜色素,产生的菌落有明显的橙红色到橙红色。然而,在 Pucciniomycotina 中分类的大量其他非致病菌属具有类胡萝卜素,因此具有相似的群体外观[37]。

5. 掷孢酵母属(Genus *Sporobolomyces*) 与红酵母属及 *Cystobasidium* 属菌种相似,菌落通常是柔滑的、呈现橙红色或浅橙色[37]。出芽生殖时呈现椭圆形酵母样,具有假菌丝、大担子梗上可见掷孢子。当掷孢子被弹射出去后,常可见于培养皿盖的内表面凝结的液滴中(图 120-2c)。

6. 毛孢子菌属及其近缘属 *Apiotrichum* 和 *Cutaneotrichosporon* 该类酵母在常规实验室培养基上均能较好生长;菌落通常在 1 周内出现在固体培养基上,并呈奶油色。菌落外观有相当大的差异,成熟的菌落可形成干燥、湿润、有光泽、褶皱状、脑回状或隆起状的形态,伴或不伴边缘年轮样的生长。

它们产生各种形状的芽生分生孢子、发育良好的菌丝、假菌丝和关节分生孢子(图 120-2a)。根据生长培养基的不同,*Apiotrichum loubieri* 可产生 1～2 个腔的巨细胞[51],而 *Apiotrichum mycotoxinivorans* 产生的巨细胞通常具有 8 个腔(取决于生长培养基的种类)(Hazen KC,Moore DG,Padgett DE,未发表的观察)。当毛孢子菌在生长过程中只产生少量的芽分生孢子时,难以与地丝菌属菌种(Geotrichum spp.)和其他的关节孢子菌鉴别(图 120-2d 和 120-2e)。

三、流行病学和传播

医学上重要的酵母菌通常在人类、恒温动物及其栖息的环境中被发现[42,52]。食物、植物、饮用水和果汁(巴氏杀菌和未消毒的)等环境样本显示存在多种条件致病酵母菌。在所有情况下,这些酵母的存在可以归因于恒温动物直接和间接的污染,例如,Arias 等[53]报道橙汁经巴氏消毒后再被近平滑念珠菌、热带念珠菌、葡萄牙念珠菌和涎沫念珠菌及其他几个酵母菌污染。这些结果表明免疫功能低下患者的感染是由于反复暴露于潜在的病原真菌而不是那些定植于人体的正常菌群。在制备食品时应小心并监测可能用于患者的餐具或奶油的污染水平[54-55]。肠外营养液和装置极易被酵母菌污染,尤其是近平滑念珠菌[56]。值得注意的是,医院环境有助于发展念珠菌属的定植,以及促进毒力强的菌株取代毒力弱的菌株定植[57-59]。

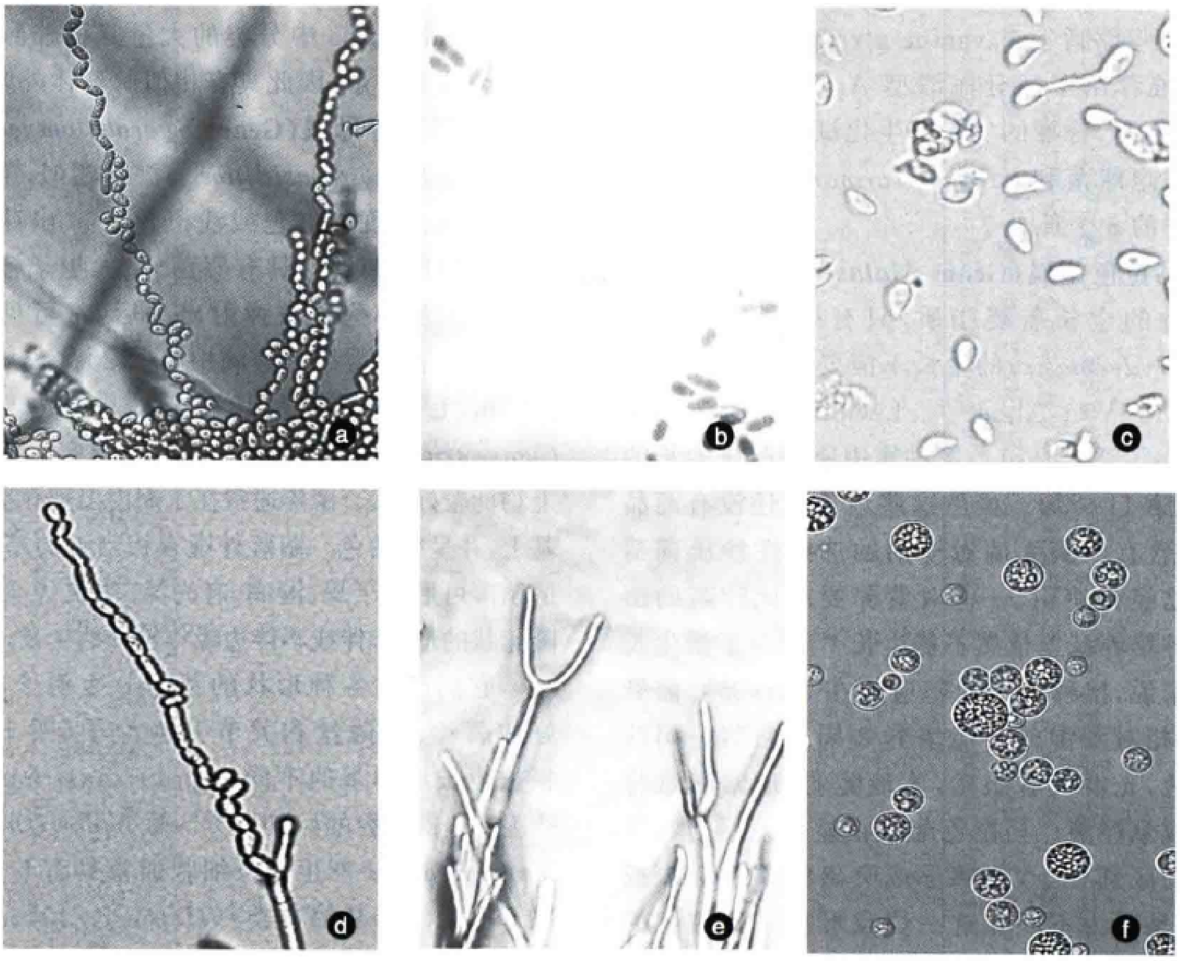


图 120-2 一些少见的病原性酵母和酵母样菌在玉米粉琼脂培养基、环境温度下培养 24～48 h 的形态特征

注：a. 毛孢子菌属：在关节孢子的拐角处形成带有芽生分生孢子的关节孢子链；b. 糠秕马拉色菌：呈现瓶型、环痕分生孢子和囊领的芽殖酵母；c. 掷孢酵母属的掷孢子；d、e. 念珠状地丝菌（白地霉）的关节孢子（d）和特征性的二分支（e）；f. 威克汉姆无绿藻中包含孢囊孢子的孢子囊；放大倍数，×400（照片由 Adrien Szekely 提供），见彩插

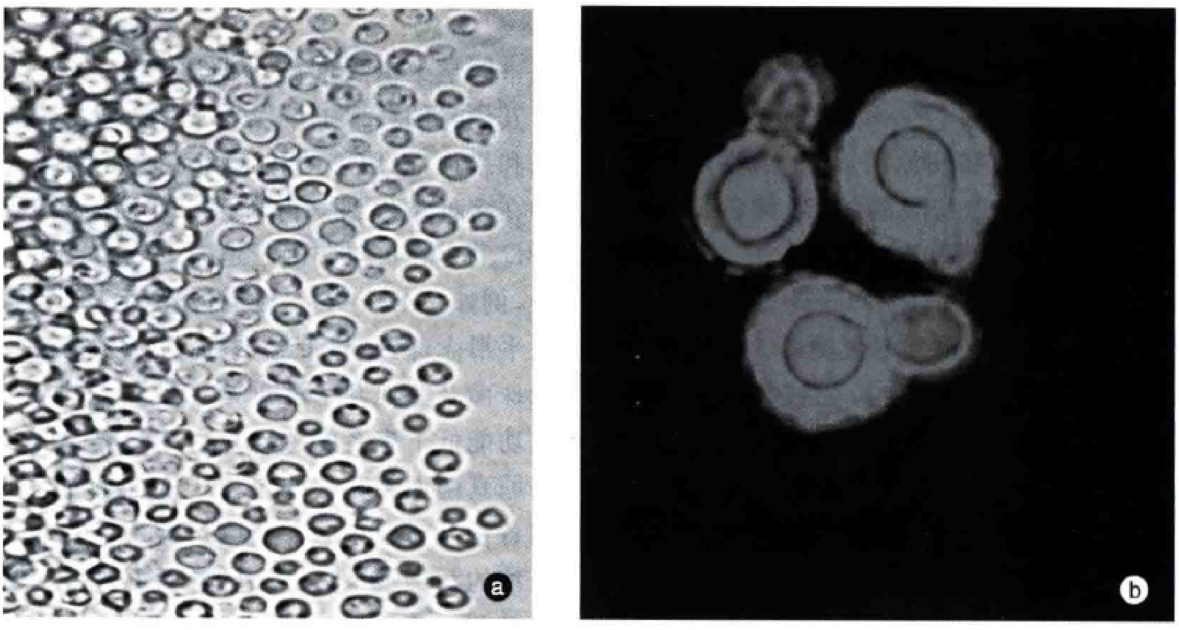


图 120-3 a. 新型隐球菌在玉米粉琼脂培养基、环境温度下培养 48 h 的外观，放大倍数×400；b. 新型隐球菌印度墨汁染色，放大倍数，×1000，见彩插

除了耳念珠菌外[58-59]，人与人的传播对疾病发展的影响较小。在医院感染暴发事件中手或污染物通常是来源。侵袭性酵母菌感染多为条件致病，因此，酵母菌引起疾病时，必须先定植，这样才能导致疾病的发作。一些研究显示酵母菌可经性接触(包括口腔)传播，但受者发生真菌感染受多种因素影响，尤其是当前的正常菌群、免疫状态和抗真菌治疗状况等[60-61]。

(一)念珠菌属(Genus *Candida*)

念珠菌属是无处不在的，是许多植物、哺乳动物消化道和人类皮肤黏膜的正常菌群[42]。基本上，所有地区人群的胃肠道(gastrointestinal, GI)都可以有念珠菌的定植。最常见的人类胃肠道分离菌种(50%～70% 的酵母菌株)是白念珠菌，其次是热带念珠菌、近平滑念珠菌、克柔念珠菌和光滑念珠菌[62]。

在美国和许多发达国家，念珠菌血症是第三或第四位最常见的医院获得性血流感染，在重症监护室(intensive care units, ICU)或外科病房的非中性粒细胞减少患者中，一半以上的脓毒症是由念珠菌血症引起[10,63]。大多数念珠菌血症是由5种酵母菌(白念珠菌、热带念珠菌、近平滑念珠菌、光滑念珠菌和克柔念珠菌)中的一种引起，所占比例在不同的国家和不同的患者人群中不一[64]。美国的许多医疗机构推行严格的中心静脉导管放置程序，对降低念珠菌血症发生率有很大帮助[65]。然而，由非白念珠菌引起的念珠菌血症，特别是光滑念珠菌，在美国明显的增加。2004—2008 年，PATH(Prospective Antifungal Therapy)联盟登记报告了超过 3000 例患者，显示非白念引起念珠菌血症的比例(58%)，高于白念珠菌(42%)。其中光滑念珠菌血症比例最高，占26.7%[66]。非白念珠菌感染的增加可能与易感人群的改变有关[67]。老年人比儿童更容易感染光滑念珠菌，相关的危险因素有患者年龄、基础疾病的严重程度、广谱抗生素的使用、中心静脉导管的放置、在 ICU 的居住时间、在肿瘤中心使用氟康唑等[67]。据报道有几种禽类是非人类宿主或携带光滑念珠菌的载体[20]。近平滑念珠菌在儿童血流感染中的发生率比成人更高[67]，已知该菌是好发于年轻人的病原菌[68]。

2009 年，文献报道非洲念珠菌是引起阴道炎的新病因[39]，其分离株来自非洲、西班牙、德国和意大利，英国研究证实其仅存于女性生殖道标本[15]。实际上，影响近 75%育龄妇女的外阴阴道念珠菌病是念珠菌感染的最常见表现之一。

在过去的 8 年中，耳念珠菌在三大洲同时出现，是与卫生保健相关感染的重要新病原体，具有地理上的限制性克隆谱系，以及院内和医院间高传播率[25-28]。据报道，除了念珠菌血症以外，还有各种各样的深部感染。而且这种对多药耐药的微生物在医院环境中持续存在，并且还会在高强度护理环境中导致患者长期定植，从而需要制定对携带者的管理指南[27,58-59]。

(二)隐球菌属(Genus *Cryptococcus*)

新型隐球菌影响全世界免疫受损的宿主，新型隐球菌格鲁比变种(血清型 A)是全球免疫低下宿主最常见的分离菌，尽管 *C. deneoformans*(原新型隐球菌 D 型血清型)在欧洲更常见[31]。格特隐球菌复合群中的 5 个物种主要感染该生物特有地区的免疫功能正常的宿主，尽管在博茨瓦纳和撒哈拉以南非洲的部分地区约有 10%的 AIDS 病例感染了该复合群中的某些种，特别是 *C. bacillisporus* 和 *C. tetragattii* [31,69]。

新型隐球菌于 19 世纪末首次在环境中分离，当 Sanfelice 从桃汁中分离酵母菌时发现。从那时起，新型隐球菌格鲁比变种和 *C. deneoformans* 变种大多与鸽子(包括其他鸟类)的粪便和鸟粪污染的土壤有关[31]。菌株通常不是在新鲜粪便中发现的，而是存在于窗棂上、空置的建筑物或其他栖息地上长期累积的鸟排泄物中[69]。格特隐球菌的环境栖息地最初被确定为桉树(赤桉)，还有一些其他树木考虑为污染源。一些其他的植物家族已经被确定为来源[31]。在欧洲、亚洲、大洋洲、非洲、北美洲、中美洲和南美洲的亚热带地区和温带地区已报道了格特隐球菌复合群菌株[31]。

(三)马拉色菌属

关于马拉色菌在人类和其他动物中的流行病学分布，存在相互矛盾的数据，主要取决于是使用基于培养或基于核酸的方法来评估该属 15 个成员的分布[70]。尽管物种分布似乎存在地域差异，根据大多数研究，最常见的物种是糠秕马拉色菌、球形马拉色菌、厚皮马拉色菌、合轴马

拉色菌、*M. obtusa*、限制性马拉色菌、斯鲁菲亚马拉色菌。虽然许多基于培养的研究都试图证明马拉色菌属之间的关系，但非培养技术研究表明，球形马拉色菌和限制性马拉色菌在人的皮肤上几乎无处不在[70]。医务人员的宠物犬耳道定植的厚皮马拉色菌，与新生儿系统性马拉色菌感染的暴发有关[71]。

四、临床意义

(一)念珠菌属

由于环境污染、定植或实际的疾病过程，念珠菌属可存在于临床标本中。准确诊断需要正确处理临床标本，确保标本及时到达实验室并以合适的方式接收和储存。念珠菌属正常菌群，在患者因疾病或医源性干预导致免疫防御受损的情况下，可以侵入组织，并产生危及生命的病理反应。

白念珠菌是从几乎所有形式的念珠菌病中分离出来的最常见物种[42,64]。如上所述，其在正常人群中的高流行率导致了高致病率。此外，白念珠菌具有大量的毒力因子，可促进成功寄生，包括蛋白酶，黏附素，侵袭素和表面整合素的表达，形成生物膜的能力，代谢适应性，表型转换，触变性和多种水解酶的分泌[72-73]。

在人类及动物和无脊椎动物感染模型中，只有热带念珠菌[74]和耳念珠菌[13,75]似乎具有与白念珠菌相似的毒力。其他在临床标本中出现频率较低的医学重要念珠菌包括 *C. blankii*、链状念珠菌[*C.* (*Diutina*) *catenulata*]、西弗念珠菌[*C.* (*Trichomonascus*) *ciferrii*]、都柏林念珠菌(*C. dubliniensis*)、*C.* (*Pichia*) *eremophila*、光滑念珠菌[*C.* (*Nakaseomyces*) *glabrata*]、*C. glaebosa*、季也蒙念珠菌[*C.* (*Meyerozyma*) *guilliermondii*]、希木龙念珠菌(*C. haemulonii*)、平常念珠菌[*C. inconspicua* (*Pichia cactophila*)]、乳酒念珠菌[*C. kefyr* (*Kluyveromyces marxianus*)]、克柔念珠菌[*C. krusei* (*Pichia kudriavzevii*)]、郎比可念珠菌(*C. lambica*)、解脂念珠菌[*C.* (*Yarrowia*) *lipolytica*]、葡萄牙念珠菌[*C.* (*Clavispora*) *lusitaniae*]、挪威念珠菌[*C.* (*Pichia*) *norvegensis*]、近平滑念珠菌复合群(*C. parapsilosis* species complex)、pelliculosa 念珠菌[*C. pelliculosa* (*Wickerhamomyces anomalus*)]、铁红念珠菌[*C.* (*Metschnikowia*) *pulcherrima*]、皱褶念珠菌复合群[*C.* (*Diutina*) *rugosa* species complex]、产朊念珠菌[*C. utilis* (*Cyberlindnera jadinii*)]和涎沫念珠菌(*C. zeylanoides*)[11,12,55,66,67,76]。氟康唑是用于治疗念珠菌病的首选药物，但克柔念珠菌天然耐药、耳念珠菌具有抗性、光滑念珠菌分离株可能具有不同的敏感性。其他 2 种对氟康唑耐药的 *C. inconspicua* (*Pichia cactophila*) 和 *C.* (*Pichia*) *norvegensis*，是念珠菌病的罕见病原体。作为一种重要的病原体，光滑念珠菌中相对较高比例的菌株对氟康唑的敏感性降低，最近也出现了对棘白菌素类药物有抗性的菌株[20]。光滑念珠菌被认为是人类的共生菌，可以从大多数人的口腔以及泌尿生殖道、消化道和呼吸道中分离出来，与深部和全身性、播散性疾病可能有关[20]。它也经常从尿标本中分离，据估计占尿道念珠菌感染的 20%[77]。因其生长缓慢，所以常规尿培养物应孵育至少 2 天。其他 2 种与光滑念珠菌相似的隐匿种酵母菌尼瓦利亚念珠菌(*C. nivariensis*)和布拉加念珠菌(*C. bracarensis*)共同构成纳卡菌[20,78]。据报道，这 2 种细菌都来自口咽和外阴念珠菌病病例[20]，尤其是尼瓦利亚念珠菌似乎是深部感染的新发原因。某些国家的分离株据报道所有三唑类药物的最低抑菌浓度(minimum inhibitory concentration, MIC)均升高[78]。

都柏林念珠菌是 HIV 阳性患者口咽部的分离菌，也可以在血液、尿、阴道分泌物或者其他样本内检测到，尤其是在免疫力低下宿主中[79]。急性假膜性口腔念珠菌病表现为细胞免疫功能低下，事实上，黏膜型念珠菌病常与细胞免疫缺陷有关，而全身传播通常与中性粒细胞减少有关[79]。然而，尽管它与白念珠菌有遗传关系，但大量研究表明，与白念珠菌相比，都柏林念珠菌在临床样本中的发病率明显降低，在各种感染模型中的毒性也较低[14-15,79]。近平滑念珠菌复合群[17]包括近平滑念珠菌、似平滑念珠菌和拟平滑念珠菌，与新生儿感染特别相关[80-82]。尽管已报道了包括念珠菌性外阴阴道炎在内的多种临床表现，在所有的情况下，拟平滑念珠菌尤其似平滑念珠菌远不如近平滑念珠菌[80,82]普遍，并且感染动物模型的毒性更小[80-81,83]。

本章节不逐一介绍在一些案例研究和文献报

道的少见的非白念珠菌的临床表现，有关这些生物引起的疾病谱的更多信息，请读者参阅由罕见的念珠菌属引起的感染流行病学和临床结果[10,55,66-67,84-86]的研究。

(二)隐球菌属

新型隐球菌格鲁比变种、新型隐球菌新生变种、*C. deneoformans* 和格特隐球菌复合群被认为是可感染人类的病原菌[34,87-90]。感染最常见于进展期 HIV 患者或接受外源性免疫抑制的患者[87-90]。艾滋病患者的临床表现似乎与引起感染的菌种类型无关。隐球菌感染最初是吸入肺，通常由血行播散到脑和脑膜，累及皮肤、骨骼、关节的病例已被报道。新型隐球菌播散性感染患者的尿培养常可分离出致病菌。在近 45%的艾滋病患者中，隐球菌病是首要疾病表现。由于艾滋病患者隐球菌性脑膜炎缺少易与其他感染相区分的临床症状或迹象(如头痛、高热、全身不适)，测定隐球菌抗原滴度、血液和脑脊液培养对于诊断非常有效[91]。对于非 HIV 感染者，隐球菌病可能与某些基础疾病有关，比如红斑狼疮、结节病、白血病、淋巴瘤、库欣综合征、终末期肝病、肾功能不全、器官移植和接受肿瘤坏死因子抑制剂[90]。这样的患者通常更可能在没有多灶扩散的情况下患上肺部疾病。格特隐球菌复合群更有可能在非免疫功能低下的患者中引起感染，该复合群与人类和其他哺乳动物的感染暴发有关[92-93]。尽管免疫状态低下似乎是特定的格特隐球菌复合群菌种感染的重要危险因素[34,92-93]。在北美，38%(加拿大)至59%(美国)的格特隐球菌感染者免疫功能低下[92-93]。

随着非新型隐球菌/格特隐球菌数量的增加，其中许多已被划归 *Tremellomycete* 菌属，在人类疾病中偶发。已报道的感染中约有 80%涉及罗伦隐球菌或白色隐球菌[94-95]。类似于新型隐球菌/格特隐球菌的感染，大多数患者都有中性粒细胞减少、恶性肿瘤、既往器官移植或近期使用皮质类固醇导致免疫力受损的历史，感染的另一个危险因素是使用侵入性血管装置[94-95]。

临床表现也与新型隐球菌/格特隐球菌相似，伴有真菌血症(占病例的 39%)和中枢神经系统受累(占 32%)，尽管也有肺、胃肠、眼和皮肤病变的报道[94-95]。其他坊间报道有从中央静脉导管相关真菌病[96]病例中鉴定的 *C.* (*Naganishia*) *liquefaciens*，从脑室炎病例[97]中发现 *C. uniguttulatus* (*Filobasidiumuniguttulatum*)，*C.* (*Naganishia*) *diffluens* 引起的皮下隐球菌病[98]，以及与中枢神经系统感染相关的 *C. curvatus*[99]。

(三)马拉色菌属

这些酵母菌常从恒温动物和人类的皮肤上分离得到，是正常共生菌，但也是皮肤病的病原菌。合轴马拉色菌、斯洛菲马拉色菌、球形马拉色菌和限制马拉色菌是最常见的人体定植菌[70,100]。球形马拉色菌、合轴马拉色菌和斯洛菲马拉色菌或糠秕马拉色菌是导致花斑癣的最常见病原菌，偶尔也有限制性马拉色菌[70]。其他皮肤病，包括脂溢性皮炎、特应性湿疹、牛皮癣和毛囊炎，也与类似的马拉色菌种类有关[70,100-101]，常由抗真菌药物治疗导致酵母菌数量减少而产生的临床反应所引起。然而，马拉色菌在皮肤表面数量很多，但是缺乏典型的特征帮助临床实验室诊断，这种微生物在这些疾病中的作用仍不明确。由马拉色菌引起的甲真菌病也有类似的报道[70]。此外，马拉色菌在极少数情况下会引起全身性感染，通常是重症监护病房的新生儿、接受全肠外营养加脂治疗的患者或重症监护病房的免疫功能严重受损的患者[70,100]。在几乎所有的病例中，报道的相关菌株都是糠秕马拉色菌和厚皮马拉色菌[70,100]。

(四)*Pseudozyma* 属

2003 年首次报道 *Pseudozyma* 为人类病原。在 3 例泰国患者的血液中分离出 *Pseudozyma antarctica*、*P. parantarctica*(现在都重新归类于 Moesziomyces[36])和 *P.* (*Macalpinomyces*) *thailandica*[102-103]。在美国和印度也曾报道 2 例由 *P.* (*Moesziomyces*) *aphidis* 引起的真菌血症[102-103]。最近命名 3 个新的菌种 *Pseudozyma crassa* (*Triodiomyces crassa*[36])、*Pseudozyma siamensis* 和 *Pseudozyma alboarmeniaca* (现在都为 *Ustilago*[36])，是从泰国患者的血液中分离的[104]。感染危险因素和其他少见的酵母菌一样，包括中性粒细胞减少、化疗、血小板减少症和留置导管。虽然 *Pseudozyma* 感染最主要的表现是真菌血症[102-104]，这种微生物也曾在脑脓肿和肺部感染相关的胸腔积液中分离出来[102-103]。

(五)红酵母属

红酵母菌属是潮湿皮肤上正常的定植菌，可从广泛的环境来源中分离到，包括各种食物和饮料，以及含水环境包括浴帘、浴缸灌浆、牙刷、盐和淡水[105]及游泳池[106]。2008 年系统临床病例回顾[107]了 128 例红酵母属感染病例，其中 79%是真菌血症，其他病例包括眼部感染、腹膜透析相关性腹膜炎和脑膜炎[107]。感染的主要危险因素是免疫抑制或恶性肿瘤和因留置中心静脉导管引起的并发症。然而，红酵母感染的总体死亡率低于 15%。

(六)酵母属

曾经认为酿酒酵母不致病，但现在被认为是一种新发真菌病原体，可引起鹅口疮、外阴阴道炎、脓胸和真菌血症[86,108-109]。人与人之间的接触和暴露于健康食品，益生菌和烘焙相关的商业菌株中，可能会导致菌株定植和感染人类宿主[108,110]，免疫抑制[109]、ICU 停留[108]、全静脉营养[108]和中央静脉导管[110]是引起真菌血症的重要风险因素。

(七)*Saprochaete* 属

Saprochaete 酵母通常生活在炎热干燥的夏季和温和潮湿的冬季。据报道，大多数感染病例来自南欧，特别是意大利、西班牙和法国，北纬 44°以下。在免疫抑制患者中，*S. capitata* 被认为是侵袭性真菌疾病的新病因，也有长期透析、肾移植、心内膜炎、椎间盘炎和骨髓炎患者的感染报道[111]。它广泛分布于自然界，为皮肤和胃肠道的正常菌群，被认为与甲真菌病有关[112]。2015 年发表的系统回顾文献中列出了 100 多例由 *S. capitata* 引起的感染[111]。绝大多数患者在感染时是中性粒细胞减少的，在 75%的病例中，可从血培养中分离出病菌。中性粒细胞减少症患者侵袭性疾病的死亡率很高(粗死亡率为 60%[111])，患者存活率与中性粒细胞计数的恢复和及时适当的抗真菌治疗有关。

(八)掷孢酵母属

环境中与人类感染相关的 3 种掷孢酵母是红掷孢酵母、荷斯坦掷孢酵母和赭色掷孢酵母[113]。迄今为止报道的疾病表现包括 HIV 患者的皮炎、过敏性肺泡炎、深部感染和真菌血症，或其他免疫抑制人群的内源性眼内炎和脑膜炎。

(九)毛孢子菌属

毛孢子菌属在自然界中分布广泛[34]，可引起人的浅表和全身感染及过敏性肺炎。浅表感染(白毛结节病)的特征是约 0.5 mm 的结节附着在头部、腋窝或生殖器区域的发干，主要由皮瘤毛孢子菌、卵型毛孢子菌、皮肤毛孢子菌和 *T. (Apiotrichum) loubieri* 引起，皮瘤毛孢子菌在生殖器感染中占主导地位[114]。阿萨希毛孢子菌和黏液毛孢子菌被认为是日本夏季型超敏性肺炎的主要原因，由于吸入患者家中的关节孢子而致病[115]。

相反，大多数系统性的人类感染是由阿萨希毛孢子菌、皮瘤毛孢子菌、皮炎毛孢子菌和黏液毛孢子菌引起的[116]。*T. loubieri* 是播散性毛孢子菌病的罕见病因[51,117]，*T. (Apiotrichum) mycotoxinivorans* 是能够在囊性纤维化患者气道中定植和感染的新型病原体[118]。在对 203 例侵袭性毛孢子菌感染确诊病例的系统评价中[116]，阿萨希毛孢子菌是至今侵袭性毛孢子菌病中分离出的最常见物种，近 80%的病例继发真菌血症。感染的主要危险因素是血液系统疾病、中性粒细胞减少症、实体器官移植、自身免疫性疾病、非血液学恶性肿瘤、多发伤、中心静脉导管、使用皮质类固醇和手术。在新生儿中，特别是在早产儿中也有暴发报道[116]。在接受棘白菌素类药物(所有的担子菌酵母都对其具有耐药性，见表 120-3)或两性霉素 B(不同的毛孢子菌种类对其具有不同的敏感性)的患者中观察到许多突破性感染[116]。据报道基于患者的基本情况、免疫恢复、抗真菌治疗、原发感染还是突破感染等不同，感染死亡率为 40%～90%[114,116]。

表 120-3　抗真菌药物敏感性

菌种	药物的最低抑菌浓度 MIC(μg/ml)								参考文献
	两性霉素 B	氟胞嘧啶	氟康唑	伊曲康唑	伏立康唑	泊沙康唑	卡泊芬净	特比萘芬	
白念珠菌	0.06～1.0	1[b]	0.25～64	0.06～4	0.015～1	0.03～0.12[c]	0.015～0.125	0.03～128[b]	263,[c]264
耳念珠菌	0.125～8	ND	4～>64	0.03～2	0.03～16	0.015～8	0.015～8[d]	ND	265
都柏林念珠菌	0.05～0.38	0.12	0.12～64	0.015～0.5	0.008～0.5	0.03[c]	ND	ND	2,116,263[c]
光滑念珠菌	0.125～4	ND	1～>64	0.125～4	0.03～1	0.03～4.0[c]	0.015～0.5	>128[b]	263,[c]264
季也蒙念珠菌	0.06～32	0.06～4	0.5～>128	0.06～>8	0.06～>8	0.06～8	0.03～>8	0.625～100[b]	256,266
希木龙念珠菌	0.5～32	ND	2～128	0.125～4	0.03～2	ND	0.125～0.25	ND	267
乳酒念珠菌	0.5[b]	0.03～16[b]	0.5～1[b]	0.25～0.5[b]	0.03[b]	0.03[c]	ND	0.5～50[b]	263[c]
克柔念珠菌	0.03～16	0.06～64	32～64[b]	0.5[b]	0.5～1.0[b]	0.03～0.25[c]	0.03～2.0	8～32[b]	263,[c]268
葡萄牙念珠菌	1.5～2.0	0.004～>32	0.064～6.0	0.004～0.5	0.003～0.09	0.03[c]	4～8	ND	255,263,[c]269
近平滑念珠菌	0.125～1	1[b]	0.25～8	0.015～2	0.015～1	0.03～0.12[c]	0.06～2	0.125～2[b]	263,[c]264
pelliculosa 念珠菌	0.12～1	ND	2～16	0.06～1	0.03～0.5	ND	0.03～0.25	ND	270
皱褶念珠菌	0.5～1.0	0.12～1.0	1～8	0.03～0.12	0.03～0.06	0.03[c]	ND	ND	2,116,263[c]
热带念珠菌	0.06～1	1[b]	0.05～32	0.03～4	0.03～1	0.03～>16[c]	0.015～0.125	1[b]	263,[c] 264
新型隐球菌	0.5～1[b]	2～8[b]	2～8[b]	0.5[b]	0.25[b]	0.125～0.5	>8	2～8[b]	255
奥默柯达菌	0.25～0.5	ND	2～32	0.125～0.5	0.3～0.5	ND	0.125～0.25	ND	271
真皮马拉色菌	0.03～0.12	ND	2	0.016～0.03	0.12	0.03～0.5[c]	ND	0.03～4	101,263[c]
糠秕马拉色菌	0.12～16	>64	2～32	0.03～25	0.03～16	0.03～32[c]	ND	0.03～50	101,263[c]
球形马拉色菌	0.10～4	ND	12.5～50	0.016～6.3	0.03～0.12	0.03～0.06[c]	ND	0.06～16	101,263[c]
日本马拉色菌	ND	ND	ND	0.016	ND	ND	ND	ND	101
娜纳马拉色菌	ND	ND	ND	0.016	ND	ND	ND	ND	101
钝圆马拉色菌	0.03～0.06	ND	2	0.016～1.6	0.03～0.06	0.03[c]	ND	0.03～64	101,263[c]
厚皮马拉色菌	0.12	>64	4～16	0.016～6.3	0.03～0.25	0.12[c]	ND	0.03～50	101,263[c]
限制马拉色菌	4～8	ND	0.5～1	0.016～6.3	0.03	0.03[c]	ND	0.06～4	101,263[c]
斯洛菲马拉色菌	0.5～8	>64	1～4	0.016～0.8	0.03～0.25	0.03[c]	ND	0.03～25	101,263[c]

（续 表）

菌种	药物的最低抑菌浓度 MIC(μg/ml)								参考文献
	两性霉素 B	氟胞嘧啶	氟康唑	伊曲康唑	伏立康唑	泊沙康唑	卡泊芬净	特比萘芬	
合轴马拉色菌	0.06～0.5	>64	0.25～16	0.016～0.2	0.03～0.125	0.03～0.06[c]	ND	0.03～6.3	101,263[c]
大和马拉色菌	ND	ND	ND	0.016	ND	ND	ND	ND	101
黏红酵母	0.25～0.5	ND	64	2～16	2～16	0.06[c]	ND	ND	263,[c]272
R. mucilaginosa	0.5～1	ND	0.5～>64	0.25～4	0.25～4	ND	ND	ND	2,116
酿酒酵母	0.5[b]	0.125[b]	0.25～>64	0.015～>4	0.03[b]	0.015～>4	4～8	0.125[b]	255,273
头状芽生裂殖菌	0.5～2.0	0.25～0.5	16～32	0.12～0.50	0.25～0.5	0.03～0.25[b]	ND	ND	274,263[c]
赭色掷孢酵母	0.25～16	ND	8～64	0.25～0.5	0.12～0.25	ND	ND	ND	272
阿萨希毛孢子菌	0.25～1.0	22.2[e]	1～16	0.12～1	0.12～1	0.03～0.25[c]	>8	ND	2,116,[e]263,[c] 275
类星形毛孢子菌	0.25～4.0	0.5～64	0.125～1	0.03～0.12	0.03～0.06	ND	2～>16	ND	273
卵形毛孢子菌	0.03	35.3	4.4	0.02	ND	ND	ND	ND	2,116
皮肤毛孢子菌	0.012	6.25	2.2	0.01	ND	ND	ND	ND	2,116
黏液毛孢子菌	1	50[e]	2～64	0.25～2	0.12～0.16	ND	ND	ND	2,116,[e]272

注：[a]ND. 不确定；[b]MICs 来自于 https://mycology.adelaide.edu.au/descriptions/yeasts/；[c] 泊沙康唑的 MIC 摘自参考文献[269]；[d] 给出了可替代的棘白菌素类米卡芬净和阿尼芬净的 MIC 范围；[e] 氟胞嘧啶的 MIC 摘自参考文献[2]

五、标本的采集、运输和储存

采集或运输疑似酵母菌感染患者的标本，不需要遵守特别原则。本书第117章介绍了样本的采集、运输和储存的标准操作。然而，当采集的标本被运送到实验室，需要特别注意考虑到高致病性真菌（如组织浆菌属的霉菌形式）的可能性或特别的生长条件要求（如马拉色菌需要脂质）。

应在样本处理前以某种方式向实验室提供疑似病原信息。运输标本应尽快进行，如果预计将会延迟，应将标本储存在4℃环境，酵母菌能够承受常规冷藏温度。

六、直接检测

在对材料进行适当的处理前，对临床标本进行适当的检查很有必要。此外，它能够帮助检验人员和医生获得初步判定是否排除某些致病性酵母菌。一些常用的初步观察样本中真菌的方法包括革兰染色、钙荧光白染色和使用20%氢氧化钾。如果在预处理中使用了20%氢氧化钾，不需要再使用印度墨汁或革兰染色。第118章详细地描述了各种染色和真菌实验室的检查程序。

（一）显微镜检查

在对标本进行酵母菌的显微镜检查时，可能观察到的结构特征有助于菌种的鉴别（图120-1和图120-4）：①酵母菌的大小和形状；②出芽位置的形态和出芽的数目；③是否存在荚膜；④细胞壁的厚度；⑤假菌丝的存在；⑥关节孢子的存在。对于一个经过适当处理并染色的标本进行显微镜检查，可以获得大量的信息。

1. 氢氧化钾(KOH)　用10%～30%的KOH溶液制作湿片检查，可用来区分黏液分泌物、皮肤、头发或指甲的真菌。KOH可以消化蛋白质，同时保留完整的真菌。适度的加热会加速这一处理过程，但是在使用高浓度KOH时需特别注意，因为如果过度的加热或时间过长，KOH可以快速结晶。标本的制备是将一滴液体加在玻片上，再加一滴KOH，再加上盖玻片。确保足够的KOH充分覆盖样本。对于皮肤和指甲，可以轻轻地挤压标本，以去除多余的KOH。对此类高密度材料，这些操作可以使观察真菌更容易。头发不需要挤压，就可以获得关于真菌感染类型的大量信息。用蒸馏水配制的40%二甲基亚砜可以加到KOH试剂中，制作的湿片无需加热或孵育，但需要立即检测。气泡可能会与酵母菌细胞混淆。看到出芽细胞的内部异质性的物质，可以确信观察对象是酵母细胞。组织标本常见圆形和卵圆形的物体，缺乏出芽，可能被错误地识别为酵母细胞。

在过滤紫外线的照射下，钙荧光白染色（荧光增白剂，荧光Uvitex 2B）可以提高检测真菌阳性率，它与细胞壁上的几丁质结合，表现为亮绿色[119]。除在KOH中加入一滴荧光增白剂（或对指甲标本进行KOH中消化至少1 h后）外，标本按上述方法制备。

花斑癣的诊断特征是在对皮肤刮片标本进行直接镜检中观察到马拉色菌酵母中存在短的、钝圆的马拉色菌菌丝（形态类似意大利面和肉丸子）。

2. 印度墨汁(India Ink)　这种染色通常被用于检测疑似隐球菌感染的脑脊液、尿或其他体液样本（图120-3）。通常，这种方法对于痰或其他细胞数量很多的样本并不适用。印度墨汁常用来观察黑暗背景下透明的荚膜，因为这种墨汁不能透过荚膜，表现出围绕酵母菌的清晰透明的光环。红细胞或淋巴细胞等伪影，或手套上的滑石粉出现，都会导致光环效应。因此，仔细检查存在的酵母细胞和出芽的形成是必不可少的。应把一滴离心沉淀的样本加在玻片上，加入一滴印度墨水或黑色素溶液，然后将盖玻片放在上面。这种方法相对快速，结果较为满意，但首选的方法是加盖玻片在标本上面，然后在盖玻片一边加一滴墨汁，使墨汁扩散到下面，这使得墨水出现梯度，它包含一个最佳区域检测荚膜。印度墨汁溶液应定期更换以防止被污染，或者用10%黑色素溶解在10%福尔马林溶液中（作为适当的安全防范措施）作为替代。

（二）组织切片中的酵母菌

组织切片中的真菌特点已有报道[120]。使用Fontana-Masson染色法可以在固定组织中区分

新型隐球菌和其他非暗色酵母，它将检测细胞壁中的黑色素前体。黏液胭胆红(Mucicarmine)染色可以给荚膜染色，这有助于区分隐球菌酵母和具有相似特征的其他酵母菌。组织中的新型隐球菌酵母细胞通常比念珠菌酵母圆，形态大小差异很大。

Gomori 银染色的方法可以观察到组织中的酵母菌，尽管它们会染黑，一些内部细节很难看到。PAS 染色方法也很常用，真菌物质常被染成红色。

很多文献报道了利用脱氧核糖核酸技术对福尔马林固定组织中的酵母进行鉴定[121,123]，虽然这些方法大多处于实验阶段，但它们似乎有望提供比传统方法更高的敏感性。然而，提取真菌 DNA 的质量和数量受福尔马林固定方法的影响，必须注意限制可能污染了石蜡包埋块表面的真菌扩增的可能性。一般来说，建议丢弃从块状物上切下的前两个蜡卷，以减少共生酵母污染的可能性(个人观察)。

(三)抗原检测

侵袭性酵母菌感染的症状和体征常与细菌感染重叠，需要研发基于非培养的快速诊断方法。第 119 章详细综述了抗原的检测。基于非培养方法来区别真菌与细菌感染及检测特异性菌属感染的试验已被研发出来。所有这些方法中，隐球菌抗原检测被证明是最成功的。

真菌细胞壁的独特成分特别适合作为一个真菌血清学试验的检测靶点。许多常见的致病酵母菌细胞壁含有 β-1,3-葡聚糖。有几个商品化试剂盒，如 Fungitell(Associates of Cape Cod Inc., East Falmouth, MA; 在美国和欧洲供应)、FungitecG(Seikagaku Corp., Kogyo, Tokyo, Japan; 仅在日本)、B-G-Star(Maruha Nichiro Foods, Inc., Tokyo, Japan; 仅在日本)和 Wako test(Wako Pure Chemical Industries Ltd., Tokyo, Japan; 仅在日本)，可用于检测 β-1,3-葡聚糖。尽管不同的试剂有不同的临界值[124]。建议对于阴性结果的患者进行重复检测，单独一次的阳性结果具有很好的敏感性和特异性[125]，而且重复检测的阴性结果具有很好的阴性预测值。重复检测阳性患者的样本可提高此试验的特异性[125-127]，并可以评估治疗成功或失败[127]。但是，阳性结果并不能明确是哪一种特异病原的感染，这是需要抗真菌治疗时的弱点。隐球菌不含有 β-1,3-葡聚糖，所以隐球菌感染患者该试验为阴性，在感染芽生菌属酵母的患者中同样表现不佳。

1. 念珠菌属 除了检测血清和脑脊液中的隐球菌抗原，还研发了其他属或种特异性抗原检测系统，主要集中在念珠菌血症和播散性念珠菌病。除了用于阴道分泌物检测的试纸外，还没有用于血液和脑脊液以外的体液和组织的商业检测方法。糖类抗原为检测播散性念珠菌病的几个商用试剂盒提供了有用的靶标，蛋白抗原也已研发出来。其他的抗原，如 D-阿拉伯糖醇，研发了 10 余年，已应用于 COBAS FARA Ⅱ 离心式自动分析仪(罗氏诊断系统)[128]。虽然只有少数实验室评估过 D-阿拉伯糖醇作为念珠菌血症患者标志物的临床应用前景，但这种抗原至少在某些患者群体中有希望[129]。D-阿拉伯糖醇水平似乎与治疗成功相关[130]。

Platelia Candida Ag 试验利用一种普遍存在于念珠菌属的 α-1,2-oligomannoside 为靶标，以制备的单克隆抗体 EB-CA1 进行检测。通过不断的比较研究，该试剂盒表现出了可接受的检测敏感性和特异性，尽管因临床研究和念珠菌种类的不同而有所不同。一些研究[129-131]建议推荐使用抗原和抗体(Platelia Candida Ab)同时检测，可以有助于提高念珠菌血症的早期诊断率。特异性的抗原检测可以进一步使用第二抗原 β-1,2-oligomannan，这一抗原仅存在于少数念珠菌中，包括白念珠菌、光滑念珠菌和热带念珠菌[132]。该抗原在都柏林念珠菌中的表达是不定的[133]。Serion ELISA antigen Candida(Institut Virion/Serion GmbH; Wurzburg, Germany)是一种定性和定量的检测血清或血浆中念珠菌抗原的试剂盒。相应的，Serion ELISA classic Candida albicans IgG/IgM/IgA 试剂盒对血清中白念珠菌抗体具有一定的检测能力。这些检测试剂盒都与 Platelia antigen/antibody assays 和 β-D-glucan 试剂进行了比较评估[134]。研究显示，虽然 Serion 念珠菌抗原检测可以鉴别念珠菌血症，但其敏感性低于 Platelia test 检测试剂盒。这些检测项目在欧洲已经推广使用，但是在美国尚未批准。

Pastorex Candida 和 Cand-Tec 属于免疫凝集试验，用于检测患者样本中的念珠菌抗原，尽管它

们的性能特征可能会限制临床应用。这些试剂盒的检测性能已经在近期进行了评估[135]。

2. 隐球菌属 检测血浆及脑脊液中的隐球菌抗原(荚膜多糖 GalXM)的方法已经有20余年,该方法可检测新型隐球菌新生变种、新型隐球菌格鲁比变种、*C. deneoformans* 和格特隐球菌复合群。目前,商业化试验能够克服之前特异性和敏感性不足的缺点。主要的问题是类风湿因子产生的假阳性问题。一旦破坏掉类风湿因子,当前一代的隐球菌抗原检测试验的敏感性和特异性均很高。基于乳胶凝集的抗原检测试剂盒包括 Remel 隐球菌抗原试验(Remel, Lenexa, KS)、CALAS(隐球菌抗原 LA 系统,Meridian 生物科学公司,Cincinnati, OH)、IMMY 乳胶隐球菌抗原试验(Abacus ALS, Meadowbrook, Queensland,澳大利亚)、隐球菌抗原乳胶凝集试剂盒(Bio-Rad Laboratories, Marnes-La-Coquette,法国)、隐球菌乳胶凝集试验(Wampole Laboratories, Cranbury, NJ),以及埃肯乳胶试验(埃肯,东京,日本)。隐球菌主要抗原试验是一个以酶免疫试验为基础的方法,最新的方法是金标检测卡(lateral flow assay, LFA)(IMMY 隐球菌金标检测试验,IMMY; ABACUS ALS,澳大利亚)。由于墨汁染色的敏感性低,隐球菌抗原检测筛查脑脊液已经代替墨汁染色成为隐球菌脑膜炎的主要检测方法。几项研究表明金标检测卡具有更高的敏感性[136],同时具有更短的检测时间,有测试尿样本和用于手指点刺测试的能力[137-138]。此外,某些基于单克隆抗体的乳胶凝集试验似乎不够灵敏,无法检测出由新型隐球菌或新型隐球菌/格特隐球菌引起的部分感染[139]。然而,最近的一项研究强调了在没有感染迹象的患者中,LFA 阳性但滴度较低时临床解释可能存在的问题[140]。最后,所有这些试剂在检测以前命名为非新型隐球菌但是现在划归 *Tremellomycete* 菌属的菌株时效果不确定。

目前已经发现除类风湿因子以外,其他因素也可引起假阳性结果。这些因素与播散性毛孢子菌感染、犬咬二氧化碳噬纤维菌脓毒症、恶性肿瘤、罗氏菌属(以前为口腔球菌属)菌血症、肥皂及消毒剂、羟乙基淀粉(用于液体复苏)有关[141-147]。

有人建议监测到抗原滴度降低作为抗隐球菌治疗有效的指标。然而,有报道称抗原滴度有可能在非 HIV 感染患者治疗的初期下降,但在隐球菌完全清除后一直保持200的高滴度水平[148],该作者[148]还提出 CSF 葡萄糖、氯和白细胞计数恢复到正常水平可能是更好的治疗成功的指标。培养阴性也是治疗成功的指标。

3. 其他酵母菌引起的侵袭性感染特异性试验 一直以来对于念珠菌和隐球菌以外的其他酵母菌引起的侵袭性感染的血清学研究并不多见。随着对毛孢子菌引起血流感染意识的增加,可能的方案是建议使用血清隐球菌抗原试验与相应的症状、体征及潜在感染因素相结合来诊断毛孢子菌病。

(四)核酸检测

1. 阳性血培养的检测 美国 FDA 已经批准了几个商业化的肽核酸荧光原位杂交(PNA FISH)试剂盒(AdvanDx, Woburn, MA)直接从血培养样本中检测酵母菌。这些探针从血培养物中使用种特异性 rRNA 基因序列检测白念珠菌、光滑念珠菌或热带念珠菌菌种或念珠菌复合群(如使用 Yeast TrafficLight PNA FISH 试剂盒检测白念珠菌和近平滑念珠菌均为绿色荧光)。模拟26SrRNA 的核酸肽用来与靶标 rRNA 杂交。探针上同时带有可检测的荧光基团,当探针与靶标结合时就可以检测到荧光基团。多个研究表明 PNA FISH 检测试剂对白念珠菌的特异性达到100%[149-151]。然而,产品的包装说明书中注明白念珠菌探针与拟平滑念珠菌有交叉反应。在一项最全面的研究中发现该试验有非常好的敏感性(99%)、特异性(100%)、阳性预测值(100%)和阴性预测值(99.3%)[149]。该试验能够快速(1.5 h)检测出是否存在白念珠菌并且表明是否有非白念珠菌存在[151]。最近改进探针和试剂后的二代试剂盒(QuickFISH)能够将检测时间缩短至30 min。由于血培养中可能存在混合菌种,该试验不能代替传代培养。因此,PNA FISH 试验阳性的血培养需要进行传代培养来确证没有其他的酵母菌存在。

FilmArray 血液培养鉴定系统(bioMérieux, Marcy l'Etoile,法国)是一个自动化系统,它利用巢式多重 PCR 来鉴定阳性血液培养中的病原体;已获得 FDA 批准和 CE 认证。该测试系统包括白念珠菌、光滑念珠菌、克柔念珠菌、近平滑念珠

菌和热带念珠菌，可以在 2 h 内从阳性血培养瓶中识别多菌感染[152]。与此类似，Prove-it 脓毒症检测（Mobidiag，芬兰赫尔辛基）将广谱 PCR 和基于微阵列的检测相结合，用于阳性血培养中白念珠菌、光滑念珠菌、克柔念珠菌、近平滑念珠菌、季也蒙念珠菌、热带念珠菌、葡萄牙念珠菌的鉴定。在 pan-yeast 模块中还有其他种类，如都柏林念珠菌、*C. pelliculosa*、乳酒念珠菌、*C. norvegensis*、希木龙念珠菌和酿酒酵母。使用真实的临床样本血培养分样评估，诊断敏感性和特异性分别为 99% 和 98%[153]。Luminex xTAG 多重 PCR 检测（Luminex Molecular Diagnostics，Ontario，Canada）在单个样本中检测多达 23 种真菌，使用微球悬浮技术，珠子中包含一个单独的探针，用于与不同的扩增真菌 DNA 序列杂交。本试验检测阳性血培养瓶[154-155]中念珠菌敏感性为 100%，特异性为 99%。

2. 直接从临床样本中检测 在没有预先培养的情况下，大多数直接检测人体液中真菌 DNA 的方法都被用于诊断侵袭性念珠菌病。White 等[156]和 Lau 等[157]综述了侵袭性念珠菌病的快速诊断方法，包括基于 PCR 的方法。对 54 项已发表的全血 PCR 诊断侵袭性念珠菌病的研究进行荟萃分析[158]发现，这些检测的总敏感性为 95%，特异性为 92%。然而，缺乏标准化和性能验证阻碍了这些测试被接受为真菌感染诊断标准，尽管商品化试剂的获得可以一定程度解决该问题[135,159]。

如果开发出更有效的检测样本中真菌 DNA 的方法，识别病原体所需的时间可能会缩短。Real-time PCR 可以比传统的血培养更早地检测到念珠菌，但它并不总是能检测到所有菌种的所有系统性感染病例[160-163]。Bennett[164] 和 Halliday 等人[159]对这种技术的使用进行了综合讨论，随着进一步发展，它很可能与血培养方案一起使用。

在欧洲，LightCycler SeptiFast Test M（罗氏诊断有限公司，曼海姆，德国）可用来检测全血中五种念珠菌和烟曲霉的 DNA，使用的是宽范围 ITS PCR 和熔解曲线。在参考文献[135，157，165]中提供了使用 SeptiFast Test M 的已发表研究的摘要，以及在欧洲用于实验目的的其他几种商业测试。其他最近用于快速诊断脓毒症的分子方法，包括 SeptiTest（Molzym GmbH，Bremen，Germany）和 Vyoo（SIRS-Lab，Jena，Germany），在文献[166]中进行了详细的综述。FDA 唯一批准的 DNA 探针测试是 Affirm VPIII 微生物鉴定测试（Becton Dickinson，Franklin Lakes，NJ），用于检测和鉴定念珠菌属、阴道加德纳菌和阴道毛滴虫的阴道液样本[167]。Affirm 法比分泌物湿涂片计数更容易识别念珠菌（11% 对 7%）。T2 念珠菌模块（T2 Biosystems，Lexington，MA）最近被批准直接检测血液样本中的五种念珠菌。T2MR 是一个以磁共振为基础的系统，用于检测脓毒症病原体[168]，检测限为 1～3 CFU/ml，检测常见念珠菌种类（白念珠菌/热带念珠菌、光滑念珠菌/克柔念珠菌和近平滑念珠菌）的临床特异性为99.4%[169]。

七、分离程序

从样本中分离真菌的方法是细菌分离方法的结合与延伸。其主要区别是原代分离培养基的选择。这些培养基在第 118 章进行讨论。大多数用于培养真菌的培养基中都含有抗生素，如氯霉素和庆大霉素。然而，应避免环己酰亚胺（放线菌酮）的掺入，因为只有白念珠菌、某些种类的毛孢子菌及相关属、马拉色菌等能在该药剂的存在下生长。从痰标本中分离酵母菌的一个未经证实的处理步骤是使用黏液溶解剂 N-乙酰-L-半胱氨酸（N-acetyl-L-cysteine）或 Sputolysin。

然而，对于酵母菌感染是应该考虑专门的处理步骤。例如，细胞溶解离心后再进行固体培养基接种，有助于血液或骨髓中新型隐球菌的分离[170]。对于某些酵母而言，原代培养基中需要加入一定的添加剂才能增强或支持其生长。例如，如果怀疑呼吸道样本中存在新型隐球菌，使用 Niger Seed 培养基及其相关培养基进行原代培养能够增加检测的阳性率。类似地，怀疑有马拉色菌属，在进行接种前，应用棉棒在原代培养平板上覆盖一层橄榄油。虽然对于厚皮马拉色菌来说橄榄油不是必需的，但对于糠秕马拉色菌是必须的。而一些营养要求更高的马拉色菌属即使在培养基上涂抹了橄榄油，也未必能够培养成功。检测胆汁依赖型或胆汁加强型的光滑念珠菌菌株，原代培养基中需要加入 8 μg/ml 氟康唑来增强其生长。胆汁依赖型的菌株其麦角固醇合成途径障

碍，对于氟康唑具有耐药性[171]。在鉴定某些酵母菌用的显色培养基中（如科玛嘉显色平板），该方法非常有效[172]。

即使分子生物学的方法诊断感染性病原体越来越普遍，培养基的正确选择也是至关重要的。抗真菌药物敏感试验、菌种的保存及流行病学研究都有赖于菌株的成功培养。

八、鉴定

(一)酵母菌鉴定的历史方法

既往大多数微生物实验室都采用了一种系统而费力的酵母鉴定方法。这包括对疑似致病性酵母的分离株进行初步的宏观和微观检查，然后进行快速的芽管试验(图 120-5)，以识别最常见的白念珠菌（和都柏林念珠菌）。同时，使用显色琼脂来验证菌株纯度(图 120-4)。一旦获得了纯的分离株，便使用专门的培养基进行形态学研究，以刺激分离株产生一系列形态特征，这些形态特征可与生化试验结合使用，从而产生对大多数商业酵母识别系统至关重要的识别代码。酵母鉴定物种水平主要是碳水化合物同化试验(表 120-2)，有许多可靠的商业试剂可使用，如 API 20C AUX (bioMérieux SA，Marcy l'Etoile，France)、API ID 32C（美国尚无）、Auxacolor 2(Bio-Rad，Hercules，CA)和自动化与半自动化系统(e.g.，ID 32C 和 Vitek 2 YST，bioMerieux)[173-174]。这些方法测试的是酵母菌株在氧气存在的情况下使用特定碳水化合物作为唯一碳源的能力。此外，许多商业快速表型测试旨在识别单一或多个念珠菌种类已被描述[173]。也曾有广泛的辅助试验用于酵母菌鉴定，包括硝酸盐，脲酶，酚氧化酶，快速海藻糖试验，碳水化合物发酵试验，诱导产孢及其形态特征等。这些已经在本书的前几个版本[173]中被广泛地描述过，这里不作详细的讨论。本章只集中在现行的酵母菌鉴定方法相关内容。

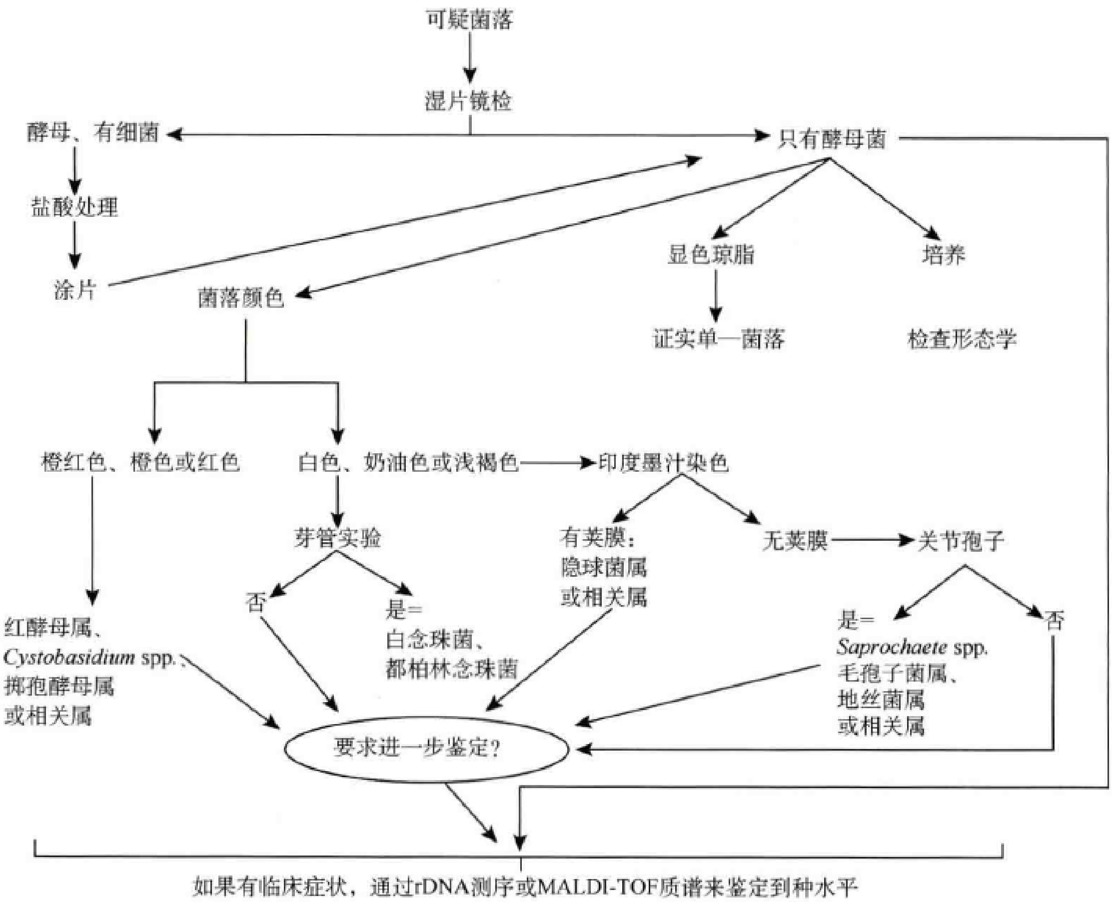


图 120-4 临床标本鉴定母菌的流程。传统的方法用米色表示，见彩插

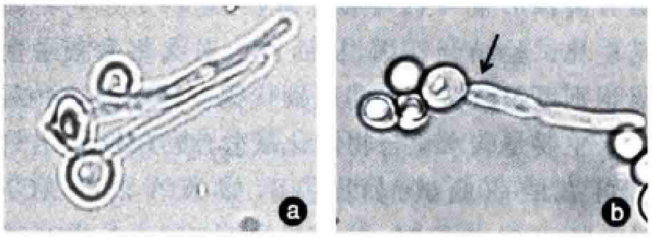


图 120-5 芽管形成试验

注：a. 白念珠菌芽管形成；b. 热带念珠菌芽生分生孢子发芽带有缢痕（箭头处），白念珠菌的芽管形成没有缢痕。放大倍数，×800（Courtesy of B. A. Davis.），见彩插

大量的研究已经比较了表型生化鉴定与使用分子方法鉴定结果的准确性[11-12,174-180]。如 PCR 扩增和多位点序列分析、核糖体 DNA（rDNA）基因焦磷酸测序[76-77,181-184]、最近的使用商品化基质辅助激光解吸电离-飞行时间质谱（matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry，MALDI-TOF MS）平台的蛋白质组学方法[185-187]。最近的荟萃分析显示[188]，传统的商品化方法可合理准确地识别常见的具有典型生化特征的念珠菌种类[11-12,174-178,188]，但对罕见致病性酵母菌种类不太有用[11-12,175-176,178,188]，不能鉴别一些常见菌种复合群中的隐型种或密切相关的物种[11-12,15,76,78,179-180,189]。这些失败是由一系列问题共同导致的，其中包括以下事实：罕见的酵母病原体通常不会出现在常规商业酵母鉴定平台的数据库中[181]；有限的生化同化特征无法界定密切相关的菌种或少见的变种[11,77,188-189]；以及至少在某种程度上，实验室不能为生化特征补充适当的形态学分析[12]。

准确鉴定酵母菌种类对流行病学很重要[15,26,66-67,78,190-191]，不同的念珠菌种类对抗真菌药物的体外敏感性差异很大[9,26,78,191-192]（表 120-3，见本书第 134 章）。曾经认为通过对单个分离株进行药敏试验，可以减轻错误鉴定的临床后果。然而，尤其近年来，通过对许多关键菌种和抗真菌药物的野生型 MIC 分布和流行病学临界值的调查，加强了可靠鉴定的重要性[192-198]。有研究对已知抗真菌药物耐药突变的治疗失败病例中分离的酵母菌株的抗真菌药敏试验结果进行分析，表明将特定抗真菌药物的通用临床折点应用于所有酵母种类是不合适的[196]。随后，对于许多常见的念珠菌属菌种，已经提出了用于解释酵母抗真菌药物敏感性试验的物种特异性折点，其中涉及棘白菌素和唑类药物氟康唑和伏立康唑[194-200]。这些物种的错误鉴定将对 MIC 数据的解释和随后的治疗干预产生潜在的深远影响。由于这些原因，本章主要侧重于基于基因组和蛋白质组学方法的鉴定策略，事实证明，这些策略比以前采用的常规生化方法能提供更可靠的鉴定。

(二)纯培养

在做任何一个试验前，一定要确认培养物为纯培养。革兰染色可以确认纯培养，但通常在进行湿片检查时就会发现是否存在细菌的污染。如果培养物中混有细菌，进行分离时应使用含有抗生素的血平板或是沙氏葡萄糖琼脂，培养产物也需要进行传代纯化或使用盐酸处理（图 120-4）。盐酸处理过程要求一个菌落分别培养在 3 个沙氏葡萄糖肉汤管中（5 ml/管）。用毛细吸管加入 1 当量盐酸 4 滴到第一管，2 滴到第二管，1 滴到第三管。25℃培养 24～48 h 后，取 0.1 ml 肉汤到新鲜的沙氏葡萄糖琼脂平板上传代培养。

一份临床标本有时可以培养出多种酵母菌，尤其当标本来自正常非无菌部位[12,201]。此外，真菌脓毒症中也可以检测到多种酵母菌。仔细注意菌落形态学及显微镜下特征能够为混合感染提供线索。除沙氏葡萄糖琼脂外，使用其他培养基对传代分离培养也是有帮助的[201]，如显色培养基能够发现不止一种酵母菌的存在。

(三)显色培养基

1 种或 2 种酵母菌可以根据显色琼脂平板上菌落特征得到初步鉴定[135,174]。念珠菌显色琼脂平板（法国科马嘉琼脂，巴黎，法国；在美国由马里兰州斯帕克斯市 BD 公司/BBL 经销）能够分辨超过 10 种酵母菌，市场出售的用于鉴定白念珠菌、热带念珠菌、光滑念珠菌和克柔念珠菌。菌落的鉴定是基于胞外酶活性不同导致不同底物分解产物显色的差异。重要的是要认识到鉴定是推测的结果。有证据表明同一种菌其菌落特征也会有差异[202]。必须严格遵守产品的使用说明，任何一种快速检测都是基于胞外酶的活性。培养时间和温度明显影响菌落的表现。显色培养基对于检测混合酵母菌感染是有用的，混合酵母菌感染在黏膜部位的分离物中特别常见，而且对真菌比对细菌

有选择性。其他显色培养基现已上市(第118章)。ChromID Candida 和 Candi Select 4 的表现也类似 CHROMagar。Brilliance 念珠菌琼脂(原 Oxoid 念珠菌显色琼脂;Thermo Fisher Scientific,英国贝辛斯托克)和 HiChrome Candida 鉴别琼脂(印度孟买 HiMedia 实验室)最近被引进。然而,没有一种培养基能检测所有血培养混合酵母菌的情况[203-204]。CHROMagar 和 ChromID 念珠菌得到了 FDA 的批准。

(四)形态学研究

根据菌株在玉米吐温琼脂、大米琼脂、马铃薯胡萝卜胆汁琼脂(Bio-Rad,Marnes-La-Coquette,法国)或其他类似琼脂上的形态,提供了将形态特征与用基因组或蛋白质组方法获得的鉴定结果关联的机会。这些特性构成许多市售生化试剂盒鉴定识别信息的一部分,并在显色琼脂上证明纯度,是基因组学和蛋白质组学方法的有效辅助手段,因为它们可以提供与形态学和基因组学相匹配的其他保证水平[12,205]。显微镜检查应该能够鉴别白念珠菌及都柏林念珠菌厚壁孢子,同时还应该注意的是假菌丝的大小和形态、芽生分生孢子沿着假菌丝的排列方式以及荚膜的存在与否(图120-1,表120-2)。

(五)芽管形成试验

芽管试验是快速推测性鉴定白念珠菌最为有效和简单的试验之一(图120-5a)。该试验之所以为推测鉴定实验,因为不是所有的白念珠菌芽管形成都是阳性的。即使是训练有素的人员操作,热带念珠菌也可能出现芽管试验假阳性[206]。显微镜下观察表明,白念珠菌最初产生的短菌丝并没有局限在芽生孢子和芽管结合处。热带念珠菌培养初期也能够产生短菌丝,但其芽生分生孢子较白念珠菌大,并且初始菌丝与芽分生孢子连接处有一个很明显的缢痕(图120-5b)。最佳的培养条件是菌落在沙氏葡萄糖琼脂中30℃生长24~48 h(观察结果尚未发表)。该试验首先用细菌接种环轻轻碰触菌落以得到微生物的一层薄膜,然后接种到试验基质上(如胎牛血清),37℃培养3 h。芽管形成试验结果判断应在2~3 h以避免初始菌丝聚集产生假阳性结果。此外,酵母菌接种过多或是存在细菌都会导致假阴性结果。

(六)分子方法

使用分子方法的明显优点是提高了准确性(如上所述)和速度。如果使用实验室自建 Sanger 测序,结果可以在菌株分离后12 h内获得,而传统的生化方法通常需要几天。然而,分子数据库的发展和标准化仍然是刚刚开始解决的问题(见下文)。

1. 常规(Sanger)DNA 测序 DNA 测序被越来越多地应用于未知酵母菌分离株的鉴定中。必须使用最可复制、最特异、最敏感的序列进行比较,大多数研究都集中在多拷贝的 rDNA 区域。大亚基,特别是 D1、D2 区域,被证明对子囊菌类的酵母有高度鉴别能力[7]。担子菌酵母[8,207]也相似,尽管有后续研究[207]使用 ITS 和基因间序列区域鉴别一些密切相关的菌种。其他也有研究使用了 ITS1 和 ITS2 区域[208-209]。Chen 等证明仅 ITS2 序列就足以鉴别念珠菌属[210]。然而,现有的大多数数据涉及 26S rDNA 或 ITS1 的测序,这2个区域的公共数据库目前覆盖最广泛[211]。Linton 等[11]使用提交给英国真菌学参考实验室的3000多个分离株进行了一项研究,评估直接26S rDNA 测序的价值。153个不能使用 Auxacolor 2 试剂盒识别的分离株均使用26S DNA 测序明确识别。类似地,Ciardo 等[212]在一项使用了1648个酵母菌株的前瞻性研究中证明 ITS1 测序优于 ID 32C 系统。这2个位点都可以在关键的念珠菌物种复合群[11-12,15,78]中鉴别出隐种,并鉴定所有现已报道过的马拉色菌属(Malassezia spp.)[35]。这2个 DNA 位点也具有系统发育价值,并被广泛用于从临床和环境样本中定义新的物种和分类学关联[34,36-37,211],以及鉴定有地理特征的耳念珠菌克隆系[28]。然而,某些属只能通过额外增加的非 rDNA 位点来解决[34,36-37]。这类方法的核心是提供准确识别的参考序列的全面数据库,可以将测试序列与之进行比较[157,176]。两个广泛使用的数据库是 GenBank(http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast)和荷兰 CBS 酵母菌数据库(http://www.westerdijkinstitute.nl/),后者包含培养收集的菌株数据库。Lau 等[157]强调有必要了解如何维护正在使用的遗传数据库。GenBank 包含未被引用的序列,并且已知会发生错误。在国际人

类和动物真菌学协会致力于病原真菌分子鉴定的工作小组的主持下，使用受控参考菌株构建的基于ITS的全面精选数据库正在不断发展[213]（http://its.mycologylab.org）。参考文献如临床真菌图谱*Atlas of Clinical Fungi*[214]对所描述的真菌包含有用的核糖体操纵子限制图。分子鉴定的方法和指南见CLSI文件MM03-02和MM18-A[215-216]。

2个商品化DNA测序和分析系统可获取。Hall等[217]证明MicroSeq D2大亚基rDNA测序系统(ABI)与API 20C AUX系统具有良好的一致性，大部分差异可归因于相关数据库中缺乏可用数据。SmartGene真菌系统（瑞士洛桑SmartGene)是另一个用于识别未知分离株的商业数据库。在最近对2938个标本的评估中，169个不能通过表型鉴定的分离株中，有79%是通过测序和SmartGene IDNS数据库[218]鉴定到物种水平的。大约一半的测序菌株是具有非典型生化特征的常见病原体，其余是罕见的酵母菌种。2种系统均未获得FDA批准。

2. 焦磷酸测序 焦磷酸测序是一种快速测定短链DNA序列的新方法，已被视为一种潜在的快速鉴定方法。在对相对较粗的真菌基因组DNA提取物进行PCR扩增之后，该技术通常可在短短90 min内在96孔微量板中产生20～40个核苷酸序列[176]。因此，可以在不到6 h的时间内从初始菌落中完成鉴定[184]。因为传统方法无法将毛孢子菌或隐球菌分离株鉴定到种水平，Montero等通过与传统方法获得的鉴定结果进行比较判断，发现超可变ITS区测序可在43个酵母菌种类的133个分离株中鉴定出69.1%的代表菌株。相比之下，Boyanton等[181]对白念珠菌、光滑念珠菌、季也蒙念珠菌、克柔念珠菌、葡萄牙念珠菌、近平滑念珠菌和热带念珠菌的60株分离株分析显示焦磷酸测序与传统鉴定方法之间的一致性100%。同样，Borman等证明了ITS2区域35 bp的焦磷酸测序可在包含近40种[76]不同物种的近500个测试菌株中正确鉴定出最具临床意义的念珠菌物种，以及能够准确解析几种关键致病性念珠菌物种复合群中的隐性物种[15,78,189]。最近的研究也表明，同样的方法可以成功地用于马拉色菌和其他非念珠菌酵母[182-183]。最后，焦磷酸测序可以直接从阳性血培养中进行，而不需要首先在真菌学培养基上分离和培养酵母[219]，这增加了更快速识别病原体的可能性。

3. 基于DNA的非直接测序方法 限制性内切酶分析（restriction enzyme analysis，REA)，使用脉冲场凝胶电泳进行核型分析及使用种属特异性探针均已用于鉴定酵母菌种，并进行了综述[174]。但是，大多数这些技术是在发现许多隐形种复合群之前开发的，因此可能无法在其中进行区分。

目前已经开发出使用ITS区的真菌鉴定用芯片。Leinberger等[220]用此方法鉴定出白念珠菌、都柏林念珠菌、克柔念珠菌、热带念珠菌和葡萄牙念珠菌。对该方法进行进一步改良后，可以将近平滑念珠菌、拟平滑念珠菌和似平滑念珠菌从包括其他10种念珠菌在内的24个其他真菌病原体中鉴定出来[221]。其他快速鉴定系统还有基于PCR的自动重复序列DiversiLab系统（法国梅里埃）。该方法使用针对非编码重复序列的引物，扩增产物在微流控芯片上分离出来形成与迁移时间对应的荧光强度的指纹图谱[222]。该方法对115株念珠菌临床分离株相邻ITS区进行序列分析所获得的结果与采用传统鉴定方法获得的结果一致性达99%[223]，尽管正确的识别依赖于一个综合的物种指纹库进行比较。Luminex multianalyte profiling平台可同时筛查多种真菌病原体，并已被用于从纯培养物[224]和直接从多种临床标本[225]（包括阳性血液培养物)[155]中鉴定念珠菌菌种。

4. 基于MALDI的方法 DNA技术的一个替代方法是MALDI-TOF质谱技术。传统上，该方法需要一个酵母纯菌落及其特征性质谱指纹图谱[185-187,205]。已有几个含数据库的商品化质谱检测系统；关于Bruker Biotyper(Bruker Daltonics)和Vitek MS(bioMerieux)系统已经有大量数据发表[226-227]，两者都已获得FDA批准。尽管多项研究表明，鉴定成功与否取决于培养物的质量和(或)菌龄及蛋白制备提取方法[205,226,228]，这种快速方法可以对直接原代培养物在不到15 min的时间内可靠鉴定出大多数致病性酵母菌[205]。实际上，Fraser等报道了使用Bruker Biotyper平台和附带的商业数据库与自建数据库结合[205]可准确鉴定(与常规rDNA测序结合焦磷酸测序相比)涵盖71种不同酵母种类的6343株酵母菌中99.8%的菌株。MALDI-TOF质谱技术可以很容易地区分大多数念珠菌[205,226-228]中的物种复合

群，但白念珠菌/非洲念珠菌除外。值得注意的是，通过补充数据库（https://biological-mass-spectrometry-identification.com/msi/），该技术还有力地鉴定了致病性的非念珠菌物种，包括毛孢子菌及近缘属[229]和隐球菌的各类变种[230-231]。尽管需要对商业数据库补充实验室自建数据库以用于罕见的新兴的病原性酵母菌，这可能是MALDI-TOF MS的局限性[205,226-231]，最新描述的可移动数据库[231]和在线Web应用程序用于MALDI-TOF真菌鉴定[232]很可能可以规避该问题。

在大多数念珠菌病病例中，血液或其他临床样本中的生物负荷太低，不能通过直接使用MALDI-TOF质谱技术。最近，该技术被用于评估离心浓缩酵母细胞和洗涤后直接从阳性血培养瓶中鉴定346株酵母[233]，结果显示对白念珠菌的检测和鉴定敏感性为96%，近平滑念珠菌为94%，热带念珠菌为87%，光滑念珠菌84%，克柔念珠菌为75%[234]。有研究报道，使用裂解-过滤或裂解-离心制备的阳性血液培养物也取得了类似的成功[234-235]。在所有研究中，结果报告时间均显著低于传统方法[233-235]，并且在大多数情况下都可以在血培养送检后24 h内获得结果。因此，MALDI-TOF MS迅速成为鉴定病原性酵母的新金标准方法，因为它具有简单、快速、耐用和每次测试成本低（在机器购置成本后）的多重优势[205,236]。

(七)解决疑难鉴定

使用传统基于碳水化合物同化作用鉴定系统的实验室经常会遇到不容易鉴定种类的酵母分离株，这些分离株很可能是产生非典型特征的相对常见的菌种，或者是商品化检测系统数据库中不包括的罕见物种[11-12,17,25,76,84,174,179,188]。对于常见的菌种，检查玉米/Dalmau琼脂上的形态常常是有用的，这是所有鉴定方法（包括分子和蛋白质组学方法）的必要辅助，因为它将帮助实验室识别鉴定和形态之间的不一致[12]。常规测试始终未能鉴定出的临床相关分离株应送至参考实验室进行DNA测序或MALDI-TOF MS分析。

已经采用分子方法的实验室遇到无法鉴定的菌株的情况会少得多（见上文）。当使用基于rDNA测序的方法时，鉴定失败通常是由于数据库中缺乏用于比较的特定代表性菌株。在这种情况下，通常可以通过对几个不同的位点（例如，28S rDNA基因、ITS1和ITS2）进行测序和对几个数据库（包括专业的和公开的同步数据库）进行查询来成功鉴定。在极少数情况下，鉴定失败可能是由于所涉及的酵母分离物是一种新颖的、迄今未描述的分类单元。在这种情况下，应将分离株送到参考实验室进行完整的系统发育分析。对于当前采用MALDI-TOF MS方法的实验室，鉴定失败通常是由于特定平台配套的商业数据库中缺少该特定生物的参考谱图所致。可扩展、可转移的参考数据库[231]的公开共享及在线MS鉴定工具[232]的可用性有望扩大可以鉴定的酵母种类范围。在查询所有当前参考数据库后仍无法通过MALDI-TOF MS鉴定的菌株，尽管产生了高质量的谱图，仍应通过rDNA测序方法来正式鉴定，必要时可以在参考实验室进行。一旦获得可靠的分子鉴定结果，就可以建立这种生物的参考图谱，并用于补充MALDI-TOF MS数据库。一般实验室仅在遇到第二个独立的分离株并通过MALDITOF MS和rDNA测序证明它们是同一物种后，才验证自建数据库。

九、类酵母样生物

有时，霉菌和藻类等微生物会在真菌培养基上生长并产生与酵母菌相似的菌落。不过仔细地观察形态学特征可以将它们区别开来。从临床标本中获得的这类易与酵母菌混淆的微生物包括地丝菌属、外瓶霉属扩展来的黑酵母和无绿藻属。念珠状地丝菌（白地霉；干、白色菌落）可以通过芽生分生孢子的产生和二分支来与毛孢子菌属及其相关属区分（图120-2e）。黑酵母在本书的其他章节述及。无绿藻属（白色至奶油色，暗或潮湿至黏液状菌落）广泛存在，生长在腐烂有机物质上，是无叶绿素的藻类，很少引起人畜疾病[237]，主要导致皮肤感染或免疫缺陷宿主的深部感染[238-239]。威克汉姆无绿藻则常见于人类感染中（图120-2f）。

十、分型系统

要了解真菌感染的流行病学、区分内外源性

感染(在外源性感染时,确定感染源)、确定传播途径、监控耐药范围等,都需要对同一物种内的不同菌株进行区分鉴定。成功的菌株分型依赖于为获得最大分辨率所选择的技术和试验条件的选择,而这则要建立在对各类菌种的检测之上。

基于DNA的分型技术始于20世纪80年代的REA技术,REA技术要求谨慎选择具有最大区分度的酶。随后发展起来的其他方法有:使用种或属特异性探针的Southern blotting技术、染色体核型分析、脉冲凝胶电泳-REA技术和随机扩增多态性DNA分析技术。这些方法都会受到突变及实验室重复性的影响,这点在相关文献中已经进行了综述[240-243]。大多数这类技术都已被更精确、复现性更好的技术如微卫星分型和多位点序列分型技术(multilocus sequence typing,MLST)所取代。Gil-Lamaignere等[240]及Taylor等[241]都对这些技术的应用及局限性进行过认真探讨。

微卫星分型是对具有多态性的短串联重复序列进行扩增,从而获得与序列中包含的重复片段数量有关的不同长度的条带。重复片段数量的变化产生于DNA复制过程,从而可以获得特异性的指纹图谱。这是一种快速分型方法,但不能用来评估菌株之间的关联性,除非对条带进行测序和比对[242]。MLST是一种准确性和复现性都比较好的指纹技术,它使用6~8个选定的管家基因序列并对核酸多态性位点进行鉴定。通过对一组基因的序列变化进行评估来确定种群结构。这就使得建立用于实验室间对比的数据库成为可能。该方法已用于对一些酵母菌种的分型[244-246]。最近还被用来揭示格特隐球菌从加拿大的温哥华岛向美国西北部地区的传播过程[247]。MLST已被用于建立格特隐球菌和新型隐球菌[248]的联合分型项目[246]。MLST还被用来证明不同时间、多个地区的大多数患者携带的白念珠菌都属于同一菌株,并且能检测出由于菌株储存而导致的微小变化[249]。然而研究显示,虽然MLST可以对中国台湾的光滑念珠菌临床分离株的种群结构提供详细信息,但使用PFGE-REA可以获得更高的分型分辨率[250]。

DiversiLab(法国bioMerieux)是一个商业平台,用于微生物病原体的鉴定和菌株分型,包括真菌[223],其基础是对真菌基因组中重复序列元件(rep-PCR)进行PCR扩增,然后根据扩增子长度用微流控芯片进行分离。尽管rep-PCR具有适用于使用通用PCR引物的任何真菌物种的优势,但它的鉴别能力低于微卫星分型和MLST[243,251],且未获FDA批准。

最近,新一代高通量测序方法的发展促进了低成本、快速的真菌全基因组测序方法的发展,在这种方法中,在整个基因组中检测到的所有核苷酸多态性都可以用来推断相关性和调查潜在的真菌疫情。全基因组测序代表了真菌菌株分型的顶峰,并已成功地用于调查耳念珠菌[26]和格特隐球菌[252]的全球流行,以及耳念珠菌[26]和*Saprochaete clavata*[253]的暴发。

十一、血清学试验

念珠菌属

侵袭性念珠菌感染是致命的,而采用血培养等非侵袭性方式进行的检测并不可靠。目前可用的检测方法采用对念珠菌甘露糖抗体的检测[例如,使用Platelia Candida Ab EIA试剂盒(Bio-Rad试验技术公司产品)],但这类检测的敏感性和特异性比较低[157],结果不理想的原因在于念珠菌属常作为正常菌群的一部分而存在,以及抗体发生作用的细胞壁靶点物质也存在于有定植发生的个体中。与抗原水平检测联合使用可以最大限度地发挥这类检测的效果,这是因为在疾病发展过程中抗体和抗原水平之间存在负相关性。抗原检测的更多详情在前一节中已经论及,兹不赘述。

十二、抗菌药物敏感性

酵母和霉菌的药敏试验方法、抗真菌药物耐药性及其机制详见本书有关章节。表120-3总结了部分文献给出的36种酵母的最低抑菌浓度(MICs)。除Lass-Flörl等[255]使用了EUCAST法、Atlas of Clinical Fungi[2]和Ashbee[101]使用了其他发表成果的数据外,表120-3中的参考文献都使用了CLSI指南。该表收录了Ashbee的综述中关于马拉色菌属的数据,因为关于该菌的药物敏感信息非常有限。针对几种念珠菌的主要抗真菌药物的折点已经确定[194-200]。念珠菌中大多对棘白菌素类敏感[190],不

过该菌属中也有一些对卡泊芬净的敏感性有差异[256]，此外在光滑念珠菌中已经出现对棘白菌素的耐药[257]。克柔念珠对氟康唑天然耐药但对泊沙康唑和伏立康唑敏感，而部分光滑念珠菌菌株可能使氟康唑的 MICs 升高。*C. norvegensis* 和 *C. inua* 也有氟康唑抗性[9,177,190-191,194]。几乎所有新出现的耳念珠菌菌株都有很高的氟康唑 MIC，针对不同地理位置的进化枝有明显的耐药突变报道[26]。此外，对两性霉素 B 或棘白菌素耐药的个别菌株已经被报道[27,58]。念珠菌在体外对两性霉素 B 耐药的种类很少，尽管葡萄牙念珠菌可能表现出继发耐药，因此，尽管体外药敏试验表明该菌株是敏感的，但临床对该药物的反应可能较差[258-259]。虽然还没有建立酵母对两性霉素 B 敏感性测试的临床折点，但已有流行病学界值的报告[260]。

文献[113]总结了目前由念珠菌属以外的少见酵母菌引起的侵袭性真菌感染的诊断、药敏试验和治疗的信息。人类常见的毛孢子菌对各种抗真菌药物的 MIC 值已被广泛评估[116]。棘白菌素类抗真菌药物对所有担子菌酵母(隐球菌、毛孢子菌、红酵母、掷孢酵母和相关菌属)均无效。

十三、结果的评价、解释和报告

随着分类关系和规则的修订，微生物的命名也在发生变化。为避免混乱，通常建议临床报告包括较常用的种属名称和所使用的新分类方法。由于文献及医疗人员和实验室人员已长期使用念珠菌的名称，因此本书没有改变这些名称，而是与有性型名称共存。这些名称在将来可能会改变，当新命名系统开始使用时，实验室人员应熟悉这些新名词。

在临床微生物学中，从样本中分离出的正常菌群或长期定植菌的意义受到多种因素影响，包括但不限于患者所患疾病、医院和地理环境、采样部位、前期抗菌药物的使用、器械的使用、样本的收集和质量及样本的处理过程。自无菌部位分离到的酵母菌，通常为感染但也要考虑样本收集方法的影响(如通过腰穿方式取得的脑脊液中的白念珠菌)。从非无菌部位样本中分离到的酵母菌，将更难判断其意义。

对文献的回顾表明，尽管在其他地方提供了关于培养结果解释的一些指导，但令人惊讶的是缺乏关于在非无菌体位中建立判定标准的循证研究[261]。临床微生物实验室对可能是真菌感染样本的评估通常采用细菌学的标准。例如，除非真菌是优势菌群(超过细菌)，一般不报告真菌。这种做法存在几个问题。首先，正常菌群中酵母的数量不如细菌多，因此相对数量的增长就有可能提示存在真菌感染。感染相同数量组织所需要的细菌要比酵母多约 10 倍。第二，来自正接受抗细菌药物治疗患者的样本，可能会含有更多的酵母，如果作出报告可能会误导医生对酵母菌意义的判断。第三，当认为酵母菌的数量不足以表明需要进一步检查时，可能不会报告菌种。这可能会导致不良后果，因为有些酵母菌(如热带念珠菌)，在免疫功能低下者体内具有较强的侵袭力。

在痰和尿(如清洁尿、留置导管和间歇导管)分离酵母菌的意义应该被质疑[262]。这些酵母菌在痰中的存在没有什么意义，因为在接受通气支持的患者的呼吸道中，念珠菌常常在呼吸道中定植。美国传染病学会最新的指南建议，抗真菌治疗不能建立在呼吸道培养阳性的基础上，如果怀疑是念珠菌肺炎，应寻求组织病理学证据[63]。同样，痰中存在少量新型隐球菌时，除非患者资料强烈表明存在肺隐球菌病，否则也没必要强调其病原学意义。为避免不必要的检测但同时又能给医生提供有用的信息，Barenfanger[262]建议对所有检出快速生长酵母菌的呼吸系统分泌物样本都报告“酵母菌，非隐球菌”，只对组织病理学提示可能是念珠菌性肺炎才进行充分的酵母菌属鉴定。事实证明只进行有限的酵母菌检测的患者住院时间更短、接受的抗真菌药物数量更少、死亡率更低、花费更少。此时如果临床医生需要，可以请求进行进一步鉴定。该方法也适用于从常规尿标本(只存在泌尿系感染时)中检出的快速生长酵母菌。尿中酵母的重要性必须在临床环境和治疗是否可取的背景下进行检查[63]。如果患者无症状，没有诱发条件，则应监测情况。如果确定了诱发条件，治疗可能是合理的，但对于有较高风险因素的患者，如新生儿或有发热和念珠菌感染风险的免疫缺陷患者，应开始治疗。除非怀疑是克柔念珠菌或光滑念珠菌感染，氟康唑是一线治疗药物；在这些情况下，可能需要短期口服氟胞嘧啶、静脉注射两性霉素 B 脱氧胆酸盐或用两性霉素 B 冲洗膀胱[63]。

尽管酵母菌表现出不同的抗真菌药物敏感性，特别是对新型广谱抗真菌药物[113]（表 120-3），但是最常见的念珠菌属通常都对三唑类、多烯类和棘白菌素类药物敏感。不过，光滑念珠菌和克柔念珠菌对三唑类药物不敏感，此外近平滑念珠菌分离株有时对棘白菌素耐药。克柔念珠菌相对来说较少从感染样本中分离出来。因此，来自非无菌部位样本的酵母菌数量可能具有临床意义时，可以只进行光滑念珠菌快速筛查。在抗真菌药物治疗无效或怀疑存在唑类耐药株的情况下，就更有必要获得酵母的抗真菌药物敏感性[63]。

参考文献请扫二维码查阅

第121章 肺孢子菌

MELANIE T. CUSHION, M. ALI RAI

（吴文娟 译；陈中举、陆玲 审校）

肺孢子菌属酵母样真菌，可存在于细胞外，具有宿主专一性和特异性。尽管曾有过肺外临床表现的报道，通常认为其侵袭部位局限于哺乳动物的肺部组织[1-2]。肺孢子菌曾经被统称为单一种属的“卡氏肺孢子菌”，现在已经明确不同种的肺孢子菌会感染不同类型的哺乳动物宿主。现有证据表明，肺孢子菌不太可能寄生于免疫系统未受损的宿主[3]，但是由于感染、免疫抑制剂的使用、先天性缺陷或营养不良及最近通过新的免疫治疗[4]引起的免疫系统受损时，可导致肺孢子菌在肺泡中增殖、定植，如果没有得到及时治疗，甚至可能引起致死性肺炎。所有的肺孢子菌均不能在哺乳动物的肺外传代培养，这也阻碍了人们对其的诊断能力和基础科学研究。目前，对肺孢子菌肺炎的治疗方法有限，因为这类真菌对两性霉素B、三唑类或棘白菌素类等抗真菌药物并不敏感。

一、分类学

1909年Carlos Chagas首次描述肺孢子菌，他将包囊形态错误定义为原生寄生虫克氏锥虫生命周期的一个阶段，使得肺孢子菌的分类存在困扰。1914年，肺孢子菌被赋予独立的身份及学名，“*pneumo-*”体现了其嗜肺的特性，“*-cystis*”体现了其典型的形态学，“*carinii*”是纪念为研究提供了涂片的意大利研究者Antonio Carini。卡氏肺孢子菌最早鉴别时推测是原生寄生虫，其潜在的真菌属性直到20世纪50年代才被提出，此后关于它是原生动物还是真菌属性的争论一直持续到20世纪后期。肺孢子菌鉴别和命名过程更详细的早期历史可见参考文献[5]。

在基于与其他真菌基因比对的最新系统分类中，将卡氏肺孢子菌（*Pneumocystis carinii*）归于子囊菌门（phylum Ascomycota），外囊菌亚门（subphylum Taphrinomycotina），肺孢子菌纲（class Pneumocystidomycetes），肺孢子菌目（order *Pneumocystidales*），肺孢子菌属（*genus Pneumocystis*）[6]。外囊菌亚门（subphylum Taphrinomycotina）包括外囊菌属（植物病原菌genera *Taphrina*）、粒毛盘菌纲（与树相关，可能为寄生*Neolecta*）、肺孢子菌属（*Pneumocystis*）和裂殖酵母属（*Schizosaccharomyces*）。

尽管从不同物种的肺中发现的肺孢子菌有不同的外形和大小，但肺孢子菌属均有相似的生命周期。例如，耶氏肺孢子菌（*P. jirovecii*）群会比啮齿类动物肺中的该类微生物大许多，在瑞吉染色时更为强烈，而且会形成多层的微生物“垫”阻碍对其生命周期各个阶段的鉴别（例如，图121-3b、图121-3d和图121-3f）。1976年，Frenkel正确地描述了人源肺孢子菌和鼠源肺孢子菌的血清学差异，并认为它们属于不同的种，在这以前卡氏肺孢子菌一直被认为是单一的动物传染病的物种[7]。现在已经明确最早被鉴定为卡氏肺孢子菌的微生物实际上是肺孢子菌属内许多不同种的集合。迄今为止，几乎所有被检测的哺乳动物身上都寄生至少一种在其他哺乳动物中不存在的肺孢子菌菌种。根据国际命名法规，5种肺孢子菌被正式命名，包括鼠源的卡氏肺孢子菌（*Pneumocystis carinii*）和大鼠源肺孢子菌（*P. wakefieldiae*）[8]、小鼠源的鼠源肺孢子菌（*P. murina*）[9]、人源的耶氏肺孢子菌（*P. jirovecii*）[5,10]和兔源的兔源肺孢子菌（*P. oryctolagi*）[11]。耶氏肺孢子菌这个名字最初虽然被一些群体反对，但最终取得了科研和临床学术界的广泛认可。

二、病原体描述

用于描述肺孢子菌生命周期阶段的术语仍有部分沿用早期将其归为原生寄生虫时的术语。在本书中，会使用更贴近其真菌性质的术语，但也会注明其他文献中常见的术语以保证阅读的连续性。目前，公认肺孢子菌有3种发育形式：营养型(滋养体)[trophic form(trophozoite)]，大小为1～4 μm(图121-1a)；孢囊型(前包囊)[sporocyte(precyst)]，5～6 μm(图121-1b)；子囊型(包囊)[ascus(cyst)]，5～8 μm(图121-1 c～e)。肺孢子菌可以在哺乳动物肺泡内实现细胞外复制。营养型在电子显微镜下显示出阿米巴样的结构，但其在新鲜标本中是椭圆形的，并且通常会与其他营养型或其他发育阶段的微生物形成群落。标本经快速瑞吉染色后，可通过光学显微镜观察到细胞核和线粒体。利用与细胞壁形成络合物实现染色的真菌染色剂无法对营养型进行染色，如六亚甲基四胺银。孢囊型比成熟的包囊要小，而且通常呈卵形。这一阶段肺孢子菌具有营养型时期不具有的坚硬的细胞壁，因此，可以被六亚甲基四胺银及其他真菌壁染色液染色。在孢囊型阶段，细胞核的数目随着细胞核分裂的不同阶段而变化(2～8个细胞核)，仍然不能区分成单独的孢子结构。在该阶段，仍能观察到线粒体的聚集。成熟的包囊呈球形，具有8个孢子(可能并非全部可见)以及厚的细胞壁，在用如六亚甲基四胺银细胞壁络合物染色法中可见，而某些染色法如瑞吉染色法则无效。包囊/子囊被认为是特征的诊断形态学结构。在临床标本中，所有的发育阶段通常都呈现为大而多层的、紧密黏附的聚合体形式存在，这就增加了鉴别区分各个阶段的难度(图121-3b,d,f)。

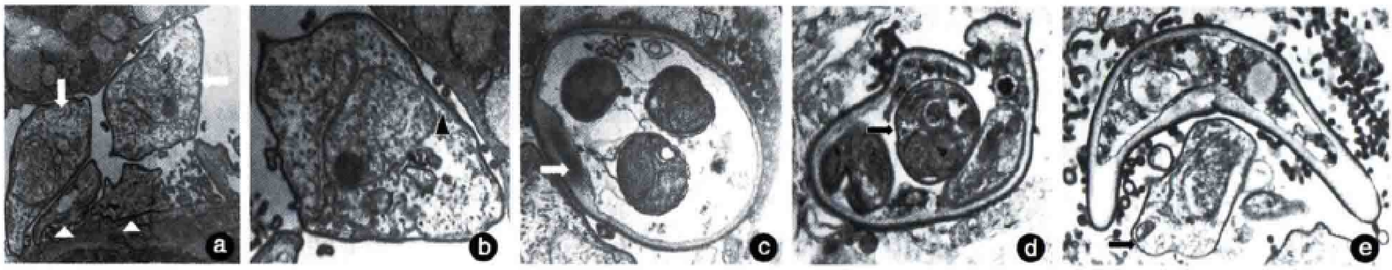


图121-1 主要发育型肺孢子菌的电子显微照片

注：a. 附着于Ⅰ型肺泡细胞(三角标记所示)和肺泡腔中2种较大的营养形态(箭头所示)；b. 孢囊型(前包囊)，注意细胞壁增厚(三角标记所示)；c. 子囊型(包囊)，带有3个可见孢子(囊内体)，细胞壁特征性增厚(箭头所示)；d. 1个孢子从子囊中排出(箭头)，另外2个仍然在子囊中；e. 孢子全部排出后塌陷的子囊，但邻近处有一个释放的滋养体(箭头)(放大1倍数，×1000)，见彩插

三、流行病学及传播

早期的动物学研究显示，肺孢子菌感染可能通过空气途径传播。未感染肺孢子菌的免疫抑制大鼠住在感染肺孢子菌大鼠的房间里或笼子里可获得感染[12]。最近，通过定量PCR对肺孢子菌肺炎(pneumocystis pneumonia，PCP)患者周围的空气标本进行研究显示，距离患者头部1 m内病原菌检出水平最高[13]。尽管随着与患者距离的增加，病原菌浓度不断下降，但是在患者病房外的走廊中采集的空气标本依然呈阳性。更为重要的是，患者感染的耶氏肺孢子菌基因型与病区外的病原菌基因型是相同的，证实这些患者就是潜在的传播源。这些数据为既往和近期发生的肾脏移植病区[14-16]和其他可能发生患者间传播的临床环境(如心脏移植受者之间)中的肺孢子菌院内感染暴发提供了证据[17]。

传播的介质可能是子囊(包囊)型，因为小鼠动物实验表明滋养体不具有传染性[18]。

(一)假定的生命周期

由于一直以来都缺乏在肺外长期培养肺孢子菌的方法，组织化学和超微结构研究构成了目前对肺孢子菌生命周期认知的基础。因此，在可以进行明确的动态分析研究之前，现有的任何一个生命周期都应当被认为是假定的。尽管由于宿主

对感染的反应，经常可以在巨噬细胞中观察到该微生物，但没有证据表明存在细胞内阶段。尽管多次试图寻找肺孢子菌的环境循环或者外部储存宿主，均未成功。越来越多的证据表明，肺孢子菌的宿主是它的哺乳动物宿主，这种情况类似于其他依赖宿主的病原体，如溶组织内阿米巴或结核分枝杆菌。对人和动物模型的研究证实，新生儿和免疫健全者都有可能成为肺孢子菌一过性或长期定植的潜在储存宿主[3]。

图 121-2 显示了在一系列组织学和超微结构学研究基础上提出的可能的生命周期图。图例中提供了详细说明。肺孢子菌的不同生命周期阶段通常可在大的互相黏附的聚集簇中观察到，其类似于体内的生物膜（图 121-2b）。鼠源肺孢子菌和耶氏肺胞子菌在体外形成的生物膜证实了这种结构的存在，并可能与对现有疗法不敏感的难治性感染有关[19]。营养型被认为是肺孢子菌的生长期，与多数酵母菌出芽生殖方式不同，它是通过二分裂法无性繁殖的。它们也可能通过类似酵母菌的交配系统进行有性繁殖，但是这个过程尚未得到证实。肺孢子菌基因组数据库中，已经鉴定出数个真菌特有的减数分裂和交配型基因同源物[20]。

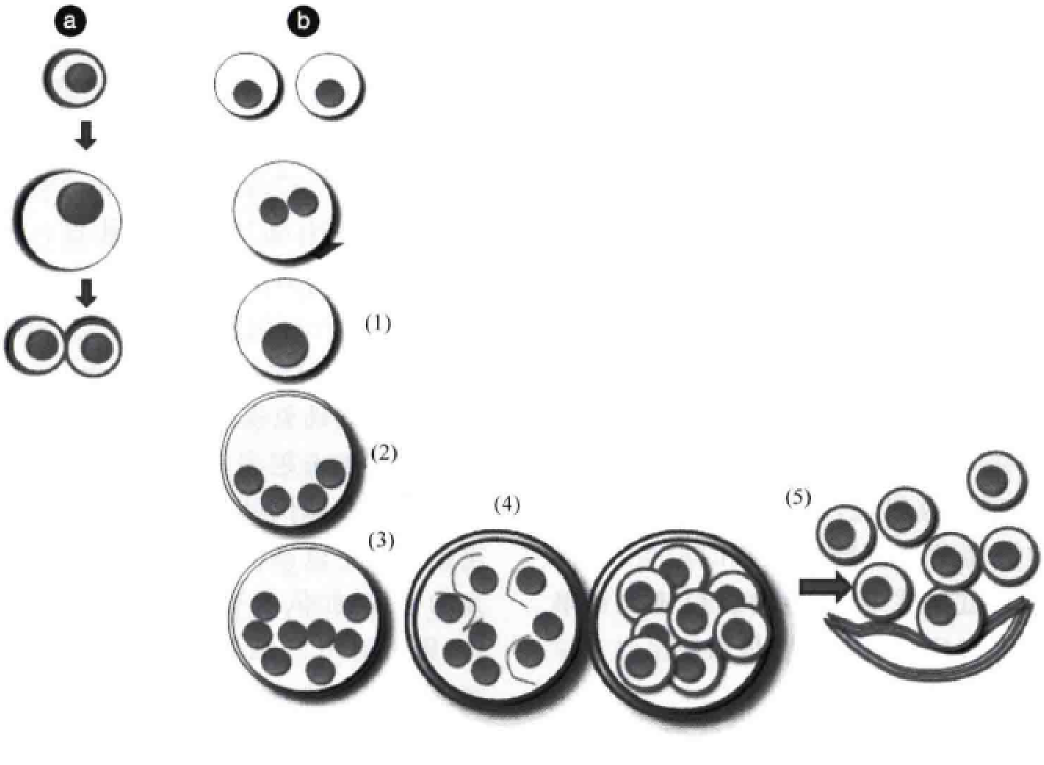


图 121-2 假定的肺孢子菌生命周期

注：a. 肺孢子菌的无性繁殖周期。营养型在细胞核有丝分裂复制后发生二次分裂。b. 假定的肺孢子菌性周期。(1) Map3 和 Mam2（相反的交配类型）融合并经历有核分裂，产生二倍体合子；(2) 合子随后经历减数分裂，产生 4 个核；(3) 额外的有丝分裂增加了核的数目，达到 8 个；(4) 细胞核和线粒体（未显示）被内质膜的内陷所分隔，产生 8 个孢子；(5) 孢子从子囊（包囊）中释放，并可能进入循环的营养期，见彩插

研究发现耶氏肺胞子菌、鼠源肺孢子菌和卡氏肺孢子菌基因组都含有一个只有 3 个参与分化的基因的单一基因组区域，证明同源性周期的存在，表明这些真菌不需要寻找互补交配型（异宗）[21]。

交配过程包括 mam2 和 ste3 2 种交配类型，交配后发生核融合，随后减数分裂和孢子生成，形成前包囊或孢囊型。减数分裂后进一步进行有丝分裂，细胞核和细胞器划区分布从而形成 8 个囊孢子。这一过程的最终产物是球形的包囊或子囊。孢子释放的过程还没有被描述过，但可能与子囊单极的局部增厚有关。值得注意的是，与其他真菌不同，肺孢子菌的所有发育阶段都含有双层膜。

(二)传播

一些不同的研究证据表明：①肺孢子菌是通过空气传播的；②它很可能在生命早期获得；③它在免疫完整的个体之间传播；④免疫抑制和感染的宿主可以将感染传播到免疫完整的宿主；⑤传

播需要短时间的接触和少量的生物体[22]。

实验数据表明，只需要很少量的微生物就可以引起肺孢子菌感染，而且它们的传播效率非常高。研究显示，少于10个的卡氏肺孢子菌已经足够引起免疫抑制的大鼠的感染[23]，而且1天的暴露时间足够形成肺孢子菌在受感染的患有严重免疫缺陷综合征(SCID)的小鼠与未感染的患有严重免疫缺陷综合征(SCID)小鼠之间的传播[24]。在饲养的健康大鼠鼠群中广泛传播的肺孢子菌不仅证实了该种感染在群体成员内传播的有效性，同时也表明在免疫健全的宿主身上该种微生物也能繁殖[25]。现今，商业商贩的畜牧业设施中还不能完全消除肺孢子菌病。从感染患者传播到免疫健全的卫生工作者的病例也时有报道[26]。越来越多的证据表明，健康的人群也可能成为传染源。近期一项对没有基础肺部疾病或免疫抑制人群的研究发现，50位受试者中，20%的口咽标本检测出耶氏肺孢子菌，检测方法为针对线粒体核糖体大亚基基因[27]的巢式PCR方法。中国一项对851例未感染HIV的肺炎患者的研究显示，耶氏肺孢子菌的阳性率为14.5%(六亚甲基四胺银染色法)和24%(PCR法)[28]。尽管缺乏母婴传播的直接证据，但最近的一项研究报道，3/4的儿童在出生后的前6个月有短暂的耶氏肺孢子菌的定植，而只有一半的母亲通过巢式PCR检测线粒体大亚单位rRNA(mtLSU rRNA)基因[29]呈阳性。

(三)流行病学

Beard等[30]报道过HIV感染人群中携带二氢蝶酸合成酶(DHPS)基因双重突变的耶氏肺孢子菌，为证明其通过人-人途径传播提供了强有力的证据，也阐明了阳性选择的机制。既往和近期的流行病学调查显示，在不同患者的居住地点或临床环境(较多发生在肾移植病区)中存在特定基因型耶氏肺孢子菌的聚集，与其通过空气进行人-人传播的猜想是一致的。日本的一篇报道记录了肾移植病区的一次肺孢子菌肺炎的暴发，一年内共有27例患者感染，而通过分子方法进行追溯，发现病原菌最初来自于门诊患者[31]。病原菌的平均潜伏天数为53天，其中最短7天，最长188天。过去20年中，有多起类似的PCP感染暴发被报道，既为免疫抑制患者在社区内的聚会提出了警示，也为疑似感染人群的预防治疗提供了经验。在某些案例中，感染患者的死亡率高达50%[32]。令人惊讶的是研究者最近指出大部分的肺孢子菌定植于肾移植病区内，可以在移植2年以后检测到病原体，而不仅仅是移植后最初的2年内[32]。但是，近期的一篇关于家族内耶氏肺孢子菌定植流行病学的研究指出，感染HIV的家长定植率为11.4%，而他们的小孩只有3.3%，提示仅仅与潜在的病原体携带者近距离接触还不足以引起感染[33]。

从20世纪70年代到80年代进行的血清学研究表明，耶氏肺孢子菌(*P. jirovecii*)获得于生命早期[34-35]。大部分人在2～4岁时即对耶氏肺孢子菌病原体或抗原呈血清反应阳性。Vargas等[36]检测了72例轻微呼吸道感染婴儿的鼻咽分泌物，其中24例婴儿检验为耶氏肺孢子菌DNA阳性，阳性率32%。在同一批79例20个月大的婴儿中，67例(85%)血清学阳性。因此，血清学检验并不是一个有效诊断PCP的方法。

(四)定植

在无基础免疫抑制人群中检测到耶氏肺孢子菌的报道越来越多，同时也有许多长期慢性疾病的患者存在耶氏肺孢子菌但不致病，这可能提示定植或宿主范围的扩张，或是一种新的免疫治疗方法导致，如依鲁替尼(ibrutinb)，一种小分子药物，用于治疗B细胞肿瘤[37-40]。定植、携带、无症状感染和亚临床感染等术语被用来描述未感染PCP时肺孢子菌微生物或DNA存在的情况。宿主携带少量肺胞子菌的后果尚不清楚，它在轻微呼吸道感染、慢性肺部疾病发展成PCP过程中起到的作用也是目前研究的一个热点。最常见的非HIV阳性人群携带耶氏肺孢子菌的可能情形包括哮喘、慢性肺部疾病、慢性阻塞性肺病、囊性纤维化、人类疱疹病毒感染、红斑狼疮、高剂量皮质类固醇治疗、肿瘤坏死因子-α治疗风湿性关节炎、甲状腺炎、溃疡性结肠炎及怀孕。儿童的定植率比成人更高。血清学研究表明，婴儿出生后的前几年就会发生暴露，例如，智利一项大型研究显示，有32%的肺孢子菌定植的婴儿表现出轻微呼吸道感染的症状[36]。该研究小组还提示定植可能与婴儿猝死综合征有关，但这一推论未得到后续研究的证实。一旦确认上述疾病的发病机制中有耶氏肺孢子菌存在的影响，针对其进行的治疗将有助

于提高患者的生存率。目前，有关 PCR 基因靶点和拷贝数临界值的讨论仍在进行，以正确诊断定植与感染[41]。mtLSUrRNA 基因最适合检测，其下限和上限分别为 3.9×10^5 拷贝/ml 和 3.2×10^6 拷贝/ml，可区分 PCP 和定植[41]。

四、临床意义

在 20 世纪 80 年代后期，据估计有 75%的艾滋病患者罹患 PCP[42]。自从抗逆转录病毒疗法和预防措施出现以来，该比例已大大降低。在西欧和美国，艾滋病患者中最近的年发病率为每 100 人 1 例[43-44]。虽然高效抗逆转录病毒疗法(highly active antiretroviral therapy，HAART)已出现，PCP 依然是目前艾滋病患者最主要的机会感染病原菌[45]。在 HAART 出现(1996 年)的前后，美国感染 PCP 的艾滋病患者死亡率并没有明显的变化，平均为 10%～13.5%[46-47]。在发展中国家和美国城市的市区，虽然可以接受 HAART 治疗，但死亡率依然较高[48-49]。后来的一项研究显示，1996—2006 年，乔治亚州亚特兰大市的医疗服务水平较低的群体死亡率为 37%，而需要使用机械辅助呼吸等积极干预的患者因 PCP 导致的死亡率可高达 80%。患有癌症或其他非艾滋病疾病的患者，死亡率并没有多大的改善，而且通常这些患者比 HIV 患者表现更差。在一项相关研究中，非 HIV 感染者的 PCP 患者死亡率为 48%，而 HIV 感染的 PCP 患者死亡率为 17%[50]。在日本，接受 8 种免疫抑制疗法的类风湿关节炎患者感染耶氏肺孢子菌肺炎后的平均死亡率是 15.5%，其中死亡率最高的是使用他克莫司(tacrolimus)的患者，而只有 1 例使用戈利木单抗(golimumab)(戈利木单抗是针对肿瘤坏死因子 α 的人源性单抗)的患者感染了 PCP 且并未死亡[51]。尽管儿科患者的 PCP 发病率在下降，但是 PCP 及其与免疫重建炎症综合征(IRIS)[52]的联系对儿科患者及易感的成人造成了严重而广泛的临床问题。

在哺乳动物的肺内，营养型肺孢子菌黏附在Ⅰ型肺细胞，推测是通过大分子桥的作用[53-54]。Ⅰ型肺细胞与肺泡毛细血管和肺泡腔之间的气体交换有关。除了附着在Ⅰ型肺细胞外，寄生物在不同发育阶段的彼此黏附，形成大的聚集并向外扩展进入肺泡腔。在未经治疗的严重感染中肺泡几乎会被病原菌占满。病原菌在负责气体交换的细胞上直接黏附，也在肺泡内不断累积，导致肺泡气体交换的失衡和肺顺应性的改变，同时肺炎也会导致一些其他的生理变化，比如缺氧[55]。

组织病理学发现有 2 个特征：①肺泡间质区的增厚；②肺腔内蜂巢状多孔嗜酸的分泌物。间质增厚是Ⅱ型肺细胞增生肥大、间质性水肿、单核细胞浸润及某些情形下轻度纤维化的结果。分泌物可以通过苏木素和伊红染色显现，因为这种染色方式不会使微生物着色，但可使嗜酸的分泌物显色。根据诊断的阶段，甲胺银或其他酵母细胞壁染色剂(如甲苯胺蓝)必须用于可视化诊断阶段的生物体的包囊/子囊形式。

(一)免疫重建炎症综合征

使用逆转录方法治疗可以提高患者的免疫能力，治疗开始后的几个月 CD4 细胞的数目也随之上升。免疫响应提升的同时，伴随着应对传染性或非传染性病原体而产生的矛盾的、逐渐加重的炎症反应，通常会造成临床恶化，这类现象统称为免疫重建炎症综合征(immune reconstitution inflammatory syndrom，IRIS)[52]。IRIS 更常在成人身上出现，通常出现在患有结核感染、PCP、隐球菌感染、巨细胞病病毒、水痘病毒或单纯性疱疹病毒的患者或进行性多灶性白质脑病患者身上。

(二)儿童表现

与前几年相比，PCP 在受艾滋病病毒感染的儿童中不那么常见[52]，但在早产儿中呈上升趋势[56]。发生率在出生第一年最高，尤其是 3～6 个月时[52]。尽管根据美国 CDC 和围产期艾滋病传播合作研究对肺孢子菌病的报告，美国婴儿的 PCP 发病率已经有了显著的下降，但在非洲地区，PCP 依然是致命的新生儿疾病。尸检分析显示，2000－2001 年期间去世的儿童中 44%患有 PCP[57]。近期的研究数据指出，对于未接受恰当的逆转录治疗或预防性治疗的 HIV 感染儿童，耶氏肺孢子菌是引起肺炎的重要原因，死亡率高达 28%～63%[58]。

PCP 最早是在儿童身上被观察到的，因此早期也被认为是一种儿童感染[59]。二战后，广泛流行于居住环境恶劣、营养不良儿童中的"间质性浆

细胞肺炎”后来被证实就是耶氏肺孢子菌肺炎。该种感染的特征是浆细胞浸润，与成人肺炎中Ⅱ型细胞的肥大和缺乏单核细胞浸润截然不同。

儿童 PCP 的临床症状包括发热、呼吸急促、呼吸困难和咳嗽。发病可以很急或很微弱，并伴随一些非特征性的症状，如轻咳、厌食、腹泻和消瘦。当通过影像学检查观察到肺炎时，不一定都有发热，但绝大部分患儿会出现急促且短浅的呼吸现象。体检时常可闻及双侧基底啰音，观察到呼吸窘迫和缺氧等症状。对于 HIV 感染的儿童，有 4 项相互独立的临床指标与 PCP 分别相关：年龄<6 个月，呼吸频率>59 次/min，动脉血氧饱和度≤92%，无呕吐现象[52,60]。

大部分患儿表现出明显的缺氧，动脉血氧分压低于 30 mmHg。$CD4^+$ 细胞计数通常低于 200cells/mm^3，但也可能高于此值。5 岁以上儿童 $CD4^+$ 的比例低于 15%。与成人类似，儿童也会出现类似磨玻璃样双侧弥漫实质浸润，但这些症状出现较少或较为轻微。

(三)成人表现

肺孢子菌感染的成人通常会表现出呼吸困难、干咳、无法深呼吸、胸闷和盗汗等症状[55,61]。通常也会有低热(如 38.5 ℃)和呼吸急促的症状，而咯血或咳痰的现象较为少见。在体检中，很少观测到明显的异常，但可以观察到不同程度的呼吸窘迫、低肺活量并闻及清晰的基底细啰音。艾滋病患者比未感染 HIV 但免疫受到抑制的患者更容易恶化。

胸部 X 线片检查可能一切正常，也可能反映出一些疾病的状态。扩散、对称、间质性浸润最常见，而局灶性浸润、肺叶实变、空洞和结节等较为少见。感染早期，浸润的范围可能会很广，但随着病情的加重，实变逐步增多。肺尖浸润和气胸发生的频率增高，与使用雾化喷他脒(pentamidine)作为常规的预防手段有关。胸部 X 线片检查中严重的异常症状可以用来预后，也与高死亡率相关。如果胸部 X 线片检查一切正常，或与前一次检查相比无变化，但患者的症状中包括干咳或呼吸急促，推荐进行肺部一氧化碳扩散能力测定(DL_{CO})。如果 DL_{CO} 结果(经血红蛋白修正)小于预期值的 75%或低于基线 20%以上，患者应进行诊断评估或支气管镜检查，或两者均进行[62]。

对于大多数患者，肺孢子菌病引起的氧化损伤可以通过与疾病的严重性和呼吸性碱中毒相关的肺泡动脉氧分压差[(A-a)DO_2]来检测[62]。但是，需要注意的是有相当一部分患者在休息时具有一个正常的(A-a)DO_2 梯度值。耶氏肺孢子菌感染可能造成的其他生理变化包括扩张能力受损、肺顺应性改变、肺总量改变、肺活量改变和缺氧等[55]。感染患者的表面活性蛋白也会出现异常，最常见的是表面活性蛋白 A 和 D 数目的增多，因为这些蛋白被认为是先天免疫的重要组成部分[63]。

(四)高分辨率 CT

胸片(X 射线)已被用于诊断 PCP，但是对肺炎的诊断还不能确定磨玻璃样浸润和其他特征，并且大约 1/3 的 PCP 患者放射学检查正常。在某些 PCP 患者中，高分辨 CT 结果具有以下特征：小叶间间隔增厚，镶嵌形态或弥散性分布的背景中，广泛存在磨玻璃样浑浊，并具有中心分布[64]。在极少数情况下，观察到异常的多结节改变[65]。在多达 1/3 的化学预防患者中，越来越多地发现了各种形状和大小的肺囊肿。在某些情况下，反晕征可能提示 PCP 的存在。这一现象通常是指被新月状或环状实质区域包围的磨玻璃状圆形区域的减少。该现象最早被认为对隐源性机化性肺炎具有特异性，后来在其他几种类型的感染或非感染疾病也可以被观察到。

(五)肺外肺孢子菌病

对感染肺部耶氏肺孢子菌患者的尸检显示，0.6%～3.0%的患者肺部以外组织检查到了肺孢子菌[1-2]。由于现在尸检的数目有限，而且缺少对肺外肺孢子菌病的认识，以及当前抗病毒疗法的功效导致免疫功能增强，这一数字可能被低估了。在患者生前，可以用六亚甲基四胺银染色或免疫荧光试剂盒来检测其组织样本或细针穿刺样本中的肺孢子菌的包囊阶段。一项对 52 例患者的调查显示，淋巴结(44%)是最常见的肺外肺孢子菌病的发生部位，紧随其后的是脾脏、骨髓和肝脏(33%)。在肾上腺、胃肠道、泌尿生殖道、甲状腺、耳、肝、胰、眼、皮肤和其他部位均曾检测到耶氏肺孢子菌(*P. jirovecii*)。多个部位肺外肺孢子菌感染往往会迅速致死。在感染的器官中也有相关的

病理表现。例如，眼部感染时可以检测到视网膜棉絮点，而骨髓病变的患者可以观察到全血细胞减少的现象。

五、标本的采集、运输和储存

发热、有呼吸道症状或胸部X线片检查时有浸润的免疫力低下的患者都应当考虑耶氏肺孢子菌肺炎的可能性。尽管大部分情况下其只会存在于肺部，但是在HIV阳性患者的肺外部位(如胸膜、腹腔内)有发现耶氏肺孢子菌的报道，因此在对这些患者进行检查时，需要进行鉴别诊断。因为耶氏肺孢子菌并没有特异性的临床症状，尽管分子生物学方法的应用在逐步增多，确诊仍然依靠形态学鉴定。已经有文章发表对PCP的临床诊断和治疗的方法及与HIV相关肺炎的鉴别诊断，读者可以阅读这些综述获得更详细的信息[66]。

因为耶氏肺孢子菌无法进行培养，目前绝大多数的鉴定手段又依赖于显微镜技术，因此，对PCP的鉴定主要依赖于合格的样本。可以在各种呼吸道标本中检测到真菌，包括诱导痰，支气管肺泡灌洗液(BALF)、气管吸出液、经支气管活检获得的组织、经支气管刷获得的细胞材料、胸膜积液和经开胸肺获得的组织活检。诊断结果取决于患者的潜在疾病状态及获取样本的人员的专业知识。在某些艾滋病患者较多的医院，护理人员接受过痰标本取样培训，其中80%的PCP诊断来自于诱导痰[67]。相反，非艾滋病患者的诊断率可能会很低，可能需要灌洗支气管肺泡或采取其他方法来确保适当的诊断[59]。应该检查非艾滋病患者的多张涂片，尤其是在高度怀疑的情况下。服务于不同人群的医院常常依靠诱导痰以外的方法。使用诱导痰作为初步筛查PCP手段的一个明显的缺点是无法获悉其他感染的信息或者肺部疾病的状态。肺外肺孢子菌病的诊断依赖于对感染部位准确的采样及后续组织切片的染色。对无法自主咳痰或不被允许采痰的婴幼儿，应当在儿童专用支气管镜的帮助下采集气管吸出物、开胸肺活检或呼吸道标本[68]。

(一)支气管肺泡灌洗

支气管肺泡灌洗液是完全的液态，无需使用消化液进一步处理。20～30 ml灌洗液在3000 *g*条件下离心浓缩15 min。浓缩物复溶在0.5～1.0 ml缓冲液或盐水中，随后用无菌涂药棒将沉淀涂布在玻片上，然后用快速染色试剂盒中的无水乙醇、丙酮或其他商品化固定液进行固定。样品量较少时，可以通过细胞离心机(Cytospin，thermoScientific，Waltham，MA)或类似仪器进行浓缩。每500 μl样品加入1滴22%的牛血清蛋白有利于样品在玻片上的附着。玻片自然晾干，随后进行染色。用不同方法染色后耶氏肺孢子菌的形态学特征会在后文继续讨论，相关总结见表121-1。

(二)诱导痰的采集

痰标本最好由肺功能实验室技术人员、呼吸治疗师或经过训练的助理在专门的设施内采集。患者吸入3%雾化氯化钠会增加液体的渗透压，刺激呼吸道，引起咳嗽并咳出支气管深部痰。在留痰前，患者应当用牙刷认真清洁牙齿、舌头、牙床，并口含0.9%氯化钠溶液5～10 min，用力漱口以尽可能除去口中的口腔细胞的残留物。不要使用牙膏，因为牙膏会影响后续标本的采集和染色。诱导痰标本通常是半透明的黏液，少数情况下是脓样的。如果未染色标本中含有耶氏肺孢子菌菌团，直径通常为0.1～0.2 mm，呈奶油色或驼色。痰标本直接涂片并染色的敏感性低于消化剂处理并浓缩后的结果[69]。

诱导痰标本的消化可以通过同等体积(至少2 ml)预先配制的0.0065 M的二硫苏糖醇(Stat-Pak Sputolysin；Cladon-Biotech，Carlsbad，CA)或0.5%的N-乙酰基-L-半胱氨酸，然后，在35 ℃的摇床孵化并间断性地进行强力涡旋震荡，直到标本几乎完全液化(完全液化会导致耶氏肺孢子菌菌团的扩散，增加镜检的难度)。有些流程要求增加清除剂以取得最好的检测结果[如Light Diagnostic Pneumocystis carinii DFA Kit(Millipore，Billerica，MA)]。标本随后在3000 *g*条件下离心浓缩5 min，浓缩后的沉淀涂布在玻片上，自然风干后，置于加热块(50～60 ℃)上进行热固定。长时间的热固定(约30 min)对把样本固定在玻片上非常重要，因为大部分天然细胞的附着物都已在消化阶段被清除了。载有固定样片的玻片随后进行染色和镜检(见后文)。样本同样可以用细胞离心机进行浓缩，如支气管肺泡灌洗一节中所述(见前文)。

表 121-1 耶氏肺孢子菌(*P. jirovecii*)鉴定所用的不同染色方法的比较

染色方法	操作时间	包囊壁	营养型和其他类型	优势	劣势
Giemsa	30～60 min	不染色；包囊壁外形为包围在孢子/囊内小体外周的清晰的环	细胞核染成紫红色；细胞质染成浅蓝至深蓝，与菌落的厚度和深度有关	便宜；染色操作简单；使肺孢子菌所有生命循环阶段染色；使其他病原菌（如细菌，寄生虫，真菌）和宿主细胞染色	需要有经验的读片者将肺孢子菌从染色的宿主细胞中区分出来
快速类 Giemsa 染色（如 Diff-Quik，Hema 3）	<5 min				
荧光素结合单克隆抗体试剂盒（直接或间接的免疫荧光）	15～30 min	染色，呈苹果绿荧光；包囊组分通常不染色（显黑色）或很浅；包囊壁的折痕有时可以显现，形成皱纹的、葡萄干状的外貌	染色；外形似小多边形或球，轮廓为苹果绿；细胞核可能被染色；菌落可以染成弥散状绿色	推荐经验较少者使用；免疫荧光对肺孢子菌灵敏性和特异性高	需要荧光显微镜；试剂昂贵
六亚甲基四胺银（Gomori/Grocott）	30 min（微波炉）；1～2 h（快速）；6～24 h（传统）	染成棕色至黑色；包囊壁增厚（双逗号）且包囊壁上的折痕被染成棕色至黑色；不能区分空包囊和有孢子的包囊	不染色	易于检测包囊；宿主细胞不会被染色	传统方法染色时间较长；成本中等；要使用强酸；只能使包囊型染色；会使其他真菌染色
甲苯胺蓝 O/焦油紫	1～6 h	染成紫罗兰色至紫色；包囊壁增厚，折痕染成深紫罗兰至紫；不能区分空包囊和有孢子的包囊	不染色	易于检测包囊；宿主细胞不会被染色	染色时间长；成本中等；要使用强酸；只能使包囊型染色；会使其他真菌染色
钙荧光白	<5 min	依据滤波条件染成蓝白色或绿色；包囊壁和增厚部分有强荧光	不染色	包囊荧光强烈；操作简单；便宜	需要荧光显微镜；要使用强碱；只能使包囊型染色；会使其他真菌染色；需要专家来区分肺孢子菌和其他真菌
Gram-Weigert	<5 min	包囊壁不染色；囊内小体染成紫色	营养型模糊可见	在细胞病理实验室中较为常见	染色模糊；经验丰富的观察者可以克服这一不足，但可以使用更好的染色
巴氏染色（Papanicolaou）	1～6 h	包囊壁不染色；囊内小体染成紫色	营养型模糊可见	在细胞病理实验室中较为常见	染色模糊；经验丰富的观察者可以克服这一不足，但可以使用更好的染色

(三)开胸肺活检

开胸肺活检是采样过程中最具侵入性的检查,并非常规检查。该技术还有敏感性较低的缺点[66]。但是,如果实验室接受到了这样一份标本,应当立即把活体组织印在无菌纱布上以除去多余的液体(这会干扰印迹诊断),并通过在无菌玻片上按压数个组织切面获得触摸印记。剩余的组织可以用于组织切片、微生物培养或核酸提取并进行进一步的 PCR 检测。载有触摸印记的玻片自然风干后,用无水乙醇或者快速类瑞吉染色试剂盒中的固定剂进行固定,如 Protocol Hema 3 (Fisher Scientific Inc.,Cincinnati,OH)。通过该方法染色的被感染组织会显现出营养型或包囊型的菌落,细胞核呈紫红色,细胞质呈蓝色;包囊周围有一圈染料排斥的晕(更详细的描述参见"显微镜检查"一节)。免疫荧光染色时,玻片应当被固定在丙酮或厂家推荐的固定溶液中。此外,可以基于厂家对组织类型和重量的建议,通过 gentleMACS DIssociator(Miltenyi Biotec)或 Stomacher Lab Blender(Tekmar Inc.,Cincinnati,OH)进行组织同质化(homogenization),获得浓度更高的样本。制片时,滴一滴 10 μl 匀浆,空气干燥后,根据需要进行固定和染色。

(四)支气管活检

纤维支气管镜辅助的支气管活检是目前最常用的侵入性采集组织的方法。但是,和开胸肺活检一样,这种方法现在已经很少使用。组织标本的处理方式应当与前述的开胸肺活检的处理方式一致。

(五)鼻咽抽吸物和口咽冲洗液

数份对患者的研究报告指出,可以通过耶氏肺孢子菌特异性引物的 PCR 扩增技术在鼻咽抽吸物[36,70]或口咽冲洗液[71]中检测到耶氏肺孢子菌特异性 DNA。与常规镜检联合定量 PCR 技术相比,这些微创的侵入性技术在鉴定耶氏肺孢子菌肺炎方面显示出较高的敏感性、特异性、阳性预测值和阴性预测值。因为使用 PCR 技术诊断感染性疾病已经非常普遍,这里也会介绍如何处理 OW 和 NPA 标本。这些方法对儿童患者的采样非常有帮助,因为在这些人群中,侵入性采样技术难以实施或产量较低。

口咽冲洗液标本可以通过用 10 ml 0.9% 无菌生理盐水漱口 1 min 获得[27,72]。标本随后在 2900 *g* 条件下离心 5 min 并保持在 −20 ℃ 的温度下,直到 DNA 被完全提取。在 56 ℃ 条件下用蛋白酶 K 酶解 2 h 后,可以使用商品化试剂盒提取 DNA 或 RNA。

用抽吸导管和无菌生理盐水收集鼻咽抽吸物[36]。如果收集的标本量少或黏度很高,则应通过导管冲洗无菌盐水以稀释标本或将其添加到最终的收集管中。然后可以用黏液溶解剂处理样本,然后对其进行染色(如上所述),或者通过 DNA 或 RNA 提取进行 PCR 制备(如下所述)。

六、直接检测和鉴定

(一)显微镜检查

多种不同的染色方法曾被用来鉴定耶氏肺孢子菌。苏木素和伊红染色,是最常被病理学家采用的组织切片染色方法,它们不会使微生物着色,而是外表被染成肺泡泡沫状渗出物,被描述成蜂巢状。在镜检中能显示出微生物形态学的染色剂,即可在临床实验室用于诊断。

用于诊断 PCP 的常见染色方法是六亚甲基四胺银,它也可以染色其他真菌(表 121-1,图 121-3c)。通过用高碘酸处理,真菌的细胞壁和膜多糖被氧化为醛,这继而在碱性 pH 下将银离子还原为金属银。添加金盐可使复合物稳定,并通过硫代硫酸钠漂洗除去过量的银。六亚甲基四胺银染色剂的改良形式(如 Grocott,Gomori)可用于组织切片和体液(如 BALF 或诱导痰)[73-75]。银染色的缺点包括溶液的不稳定性、金属注入的不可控性及染色需要的时间较长(1~2 h 或 6~24 h;请参阅表 121-1)。这些缺点已经在很大程度上被使用实验室标准微波炉来控制流程的试剂盒和商品化的试剂解决(如 rapidmicrobiology,Gomori's Methenamine Silver Staining Kit for Fungi Detection; Merck Millipore,Darmstadt,Germany)。与其他真菌不同,耶氏肺孢子菌不会出芽,这一特征可以被用来区别该类微生物和其他在肺部发现的出芽真菌,如荚膜组织胞浆菌。银染过的包囊有与众不同的黑色杯状的形态,与绿色的宿主细胞大不相同。在某些染色反应中,包囊细胞壁增厚

形成“双逗号”的形态。多数情况下，细胞壁上的褶皱染上介于深棕色和黑色之间的颜色，变成皱纹状、类似葡萄干的外形（图 121-3c）。囊包内的次级形态无法通过此染色观察，而空的包囊（没有自生能力的）看起来与其他有 8 个孢子齐全的包囊并无差异。

其他通过与包囊细胞壁中的组分形成络合物的染色剂包括 PAS（periodic acid-Schiff）染液、甲苯胺蓝、焦油紫和钙荧光白。常用的染色剂的更多反应详见表 121-1。焦油紫与甲苯胺蓝 O 的染色结果相似（图 121-3e），缺点也相似，因为 2 种染色方式在染色前都需要加入硫酸和冰醋酸的混合物。除甲苯胺蓝染色的包囊外观上与六亚甲基四胺银染色相似，不同之处为前者染色显浅紫色。使用钙荧光白，无论使用的是商品化试剂盒（比如 Fungi-fluor; Polysciences, Inc., Warrington, PA）还是实验室制备的试剂盒，都会产生多样化的结果。该种试剂仅被设计用来检测包囊，在 420～490 nm 波段激发并在 515 nm 设置滤波器可以产生黄绿色或苹果绿的荧光，通常在包囊体内有特征性的“双括号”状着色体（图 121-3a）（译者注：前一句原文是 double-parentheses，即双括号，但图 121-3a 是双逗号，估计正文有误）。紫外波段激发（340～380 nm）并在 430 nm 设置滤波器可以产生较弱的蓝色荧光，强度不那么强烈，有时不易被观察到。请参照厂家的说明书设置最优的滤波条件。

与包囊细胞壁染色不同，吉姆萨染色和快速类染色不会使包囊/子囊的细胞壁染色，而是会使所有生命循环阶段的细胞核染上紫红色，使细胞质染上蓝色（图 121-3b）。细胞壁排斥了染剂，在内部紫红色细胞核的周围形成了一圈清洁区。需要关注的是厚垫似的形状是人类感染的特征。肺细胞一般也会存在，它们的细胞核比肺孢子菌的细胞核大得多，而且通常会染成深紫红色（图 121-3b）。使用 BALF、诱导痰或标本印记来诊断 PCP 时，推荐使用快速吉姆萨染色法，因为这种方法成本低，方便且染色速度快。商品化试剂盒如 Protocol Hema 3（Fisher Sciectific Inc., Cincinnati, OH）可以得到类似的结果。该染色过程只需要不到 1 min 的操作时间，而且所有阶段的微生物都可以被检测到。因为营养型的数目约是包囊数目的 10 倍，检测的敏感性也得到了提高。这种染色方式还可以通过证明宿主肺泡巨噬细胞（应存在于合格样本中）来衡量 BALF 标本的质量。此外，肺部环境中的其他一些细菌，如荚膜组织胞浆菌，在吉姆萨染色中也会产生独特的形态学外貌，因此也可以通过该种染色方法来快速检测这些致病菌引起的肺部感染，而这是其他染色方法做不到的。因为背景宿主细胞也会被染色，对吉姆萨染色涂片中细胞成分解读能力的培训和专业性非常重要。耶氏肺孢子菌样本量较少的实验室可以考虑使用免疫荧光染色或表 121-1 中列举的其他一些染色方式。

在免疫荧光分析（immunofluorescent assay, IFA）中，荧光素直接或间接结合的单克隆抗耶氏肺孢子菌抗体被用来针对肺孢子菌属含有普通和特异性抗原的一系列表面糖蛋白[76]。根据试剂盒中单克隆抗体的不同，染色可能是针对包囊，也可能是针对微生物的所有阶段。因为营养型的数目比包囊多，因此，使用针对微生物所有阶段的染色剂会更加敏感，如 Millipore/Sigma's LIGHT DIAGNOSTICS Pneumocystis carinii DFA Kit 和 Bio-Rad 生产的一款针对肺孢子菌所有生命循环阶段的免疫荧光分析 MONOFLUO Pneumocystis jirovecii IFA Test Kit。与抗体结合或在间接分析中所使用的具有代表性的荧光素是异硫氰酸荧光素，其可产生亮苹果绿的荧光颜色。这种染色反应会在整个菌落的表面形成弥散型分布（图 121-3f）而且通常会使微生物嵌入的整个基质染色。单个的包囊/子囊会有与众不同的外环荧光和较暗的内部荧光。需要注意的是，使用直接染色方法的试剂盒可能无法和用乙醇固定在玻片表面的耶氏肺孢子菌反应，因此固定过程应当使用丙酮或者厂家推荐的固定剂。

Pananicolaou 染色法通常被用于细胞病理学样本，会使细胞外的成团菌落染色成绿色，尽管较厚的菌团也会被染色而显示出 2 种颜色，一种介于粉色和紫色之间，一种是绿色/蓝绿色，如图 121-3d 所示。独特的肺泡管型脱落物也可以作为诊断依据，如图中所示。类吉姆萨染色更利于观察微生物的结构。革兰染色没有清晰的微生物形态，呈现阴性（粉色）的结果。

但是，值得注意的是，较低的真菌含量会限制特别是在非 HIV 人群中发现的微观观察结果，可能导致假阴性和漏诊。因此，至关重要的是将整个临床情况与组织病理学图像结合起来。

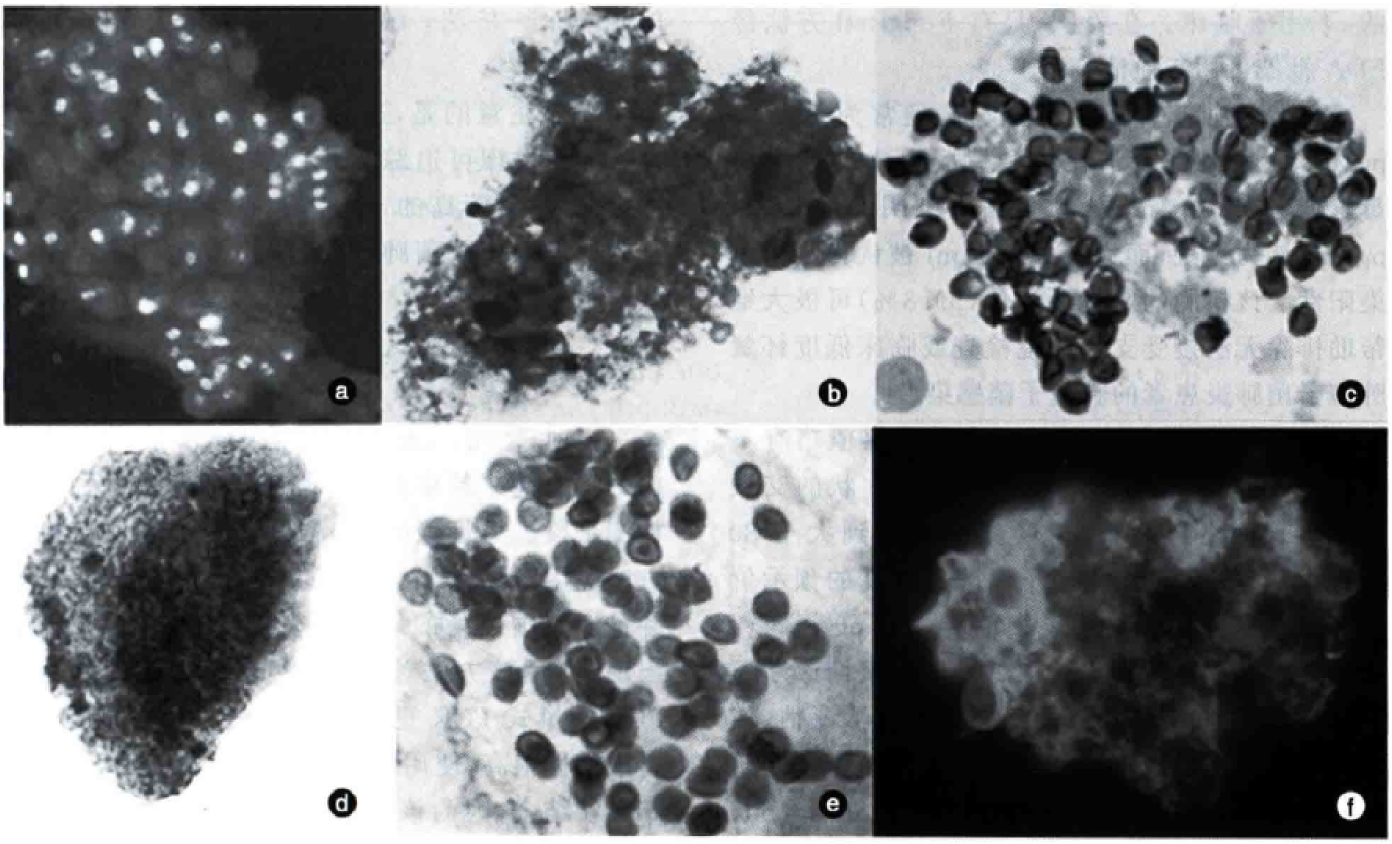


图 121-3 临床标本中耶氏肺孢子菌用不同染剂染色后的形态学和着色特征（放大倍数，×960 倍，除非另有说明）

注：a. 钙荧光白染色的 BALF。内部增厚的包囊壁（双逗号）具有非常强的荧光（颜色随使用的滤波器变化）。b. 快速类吉姆萨（Diff-Quick）染色的 BALF。可见大部分营养型的厚菌集落（2～3 μm），含有紫红的细胞核和浅蓝至紫红色的细胞质。营养型的边界在这种染色方式中难以识别。营养型互相重叠，形成更深的染成蓝色的细胞质。大片的深紫色宿主细胞核也混在菌落中。c. Gomori 六亚甲基四胺银染色（Grocott）的 BALF 中的微生物。观察到包囊壁和增厚部分（双逗号），同时能观察到收缩的茶杯形状及皱纹状、葡萄干似的外观。注意没有出芽。营养型在银染方法中不会被染色。d. Papanicolaou 染色的 BALF。注意到独特的肺泡脱落的形态；放大倍数 400 倍。e. 甲苯胺蓝 O 染色的 BALF 中的耶氏肺孢子菌。包囊壁被染成浅紫色。包囊皱纹的外观和中心染色后暗沉的小体均可以在这种染色方式中显现。注意没有出芽，也不使其他包囊壁染色。营养型也不会被染色。f. 直接荧光抗体染色的 BALF 微生物菌落。注意菌落中苹果绿荧光的分布并不均匀，包囊壁中积聚较多（团簇的左下方）。包囊内部的结构未被染色，呈黑色，见彩插

(二)血清 1,3-β-D-葡聚糖

利用检测血清中 1,3-β-D-葡聚糖(BG)水平的分析对怀疑感染耶氏肺孢子菌的患者进行诊断被证明是一种很成功的诊断方法，尤其是对无法留取合格痰标本或支气管镜检查对患者可能不安全时[77]。1,3-β-D-葡聚糖是子囊（包囊）细胞壁的一部分，在感染肺孢子菌时会大量产生。除了隐球菌（*Cryptococcus*）和接合菌纲（Mucormycetes），其他真菌感染时也会产生 1,3-β-D-葡聚糖，但耶氏肺孢子菌感染时产生的巨大的量被证明是一种有用的检测手段。一种已注册的检测试剂盒利用改进的鲎试验法(limulus amebocyte lysate，LAL)进行检测。Fungitell Assay 试剂（Associates of Cape Cod，Falmouth，MA）消除了 C 因子，因此对 1,3-β-D-葡聚糖具有特异性(http://www.acci-usa.com/clinical/fungitell/index.html)。该试剂不与其他多糖反应，包括有不同糖苷键的 β 葡聚糖。目前，Fungitell 试剂依然是推测性地诊断真菌感染，因此需要与其他诊断方法联合使用。

其他检测 1,3-β-D-葡聚糖的试剂盒包括 Endosafe-PTS(Charles River Laboratories，Charleston，SC)，Fungitec-G(Seikagaku Biobusiness，Tokyo，Japan)，beta-Glucan Test(Waco Pure Chemical Industries，Osaka，Japan)和 BGSTAR b-Glucan Test（Maruha，T okyo，Japan）。Endosafe-

PTS 和 beta-Glucan Test 试剂盒仅用于研究目的，不用于临床。在美国，只有 Fungitell 方法经 FDA 批准可用于血清。

正常人血清中 BG 水平较低，通常为 10～40 pg/ml，大概是来自消化道和胃肠道中的共生酵母。低于 60 pg/ml 认为真菌感染阴性，60～79 pg/ml 认为可疑，而大于 80 pg/ml 被认为真菌感染阳性。该检测的阴性预测值(99.8%)可极大地帮助排除无法接受支气管镜检查或临床低度怀疑肺孢子菌肺炎患者的肺孢子菌感染[78]。

BG 诊断耶氏肺孢子菌肺炎的临界值略有不同。最近的研究显示，对具有呼吸道症状的艾滋病患者，血浆 1,3-β-D-葡聚糖值升高到大于 80 pg/ml 时对确诊耶氏肺孢子菌肺炎有高的预示价值[79]，而另一篇研究建议阈值为 100 pg/ml[80]。近期的一篇荟萃分析对用 1,3-β-D-葡聚糖诊断不同类型患者的耶氏肺孢子菌肺炎进行了评估，使用一系列的临界值，敏感性可达 94.7%[77]。该研究推荐对于真菌感染，临界值应当高于 80 pg/ml，比如 100 pg/ml。其他也有研究报道了 300 pg/ml 的诊断艾滋病阳性患者的临界值[81]和 33.5pg/ml 的判断极限值[82]。

遵循供应商的说明处理患者血清非常重要，因为可能存在环境污染物。血清是当前批准用于 Fungitell 分析的唯一样本类型。溶血、脂血、黄疸或浑浊的血清不适用于 Fungitell 分析。由于真菌感染是一个动态过程，因此通常每周两次至三次重复测试可提高敏感性。假阳性结果归因于输注人血制品(免疫球蛋白或白蛋白)[83]，使用包括阿莫西林-克拉维酸盐或哌拉西林-他唑巴坦在内的抗生素[84-85]、纤维素膜血液透析[86]、血小板输注、去除白细胞的过滤器[87]，以及严重的细菌感染[88]和严重的黏膜炎[89]。有人认为，由于 BG 存在于某些支持物中，包括制造中使用的纤维素过滤器，这可能可以解释与之相关的假阳性结果[87]。即便如此，交叉反应的全部范围仍未弄清楚，尤其在高假阳性风险的人群中，该结果更加难以解释[90]。因此，至关重要的是，即使 BG 测定对 PCP 患者具有高敏感性，也应仅将其用作排除试验，并应通过肺孢子菌特异性测定来确认阳性结果。

在另一项研究中发现 BG 是 PCP 诊断最可靠的血清学生物标志物，其次是 KL-6、LDH 和 SAM。BG/KL-6 组合测试是诊断 PCP 的最准确的血清学方法，敏感性为 94.3%，特异性为 89.6%[91]。

需要注意的是，连续测定 1,3-β-D-葡聚糖的水平未被发现可追踪治疗效果，故不可用于此目的。此外，尽管高的 1,3-β-D-葡聚糖水平似乎能诊断耶氏肺孢子菌肺炎，目前仍然建议加用另一方法进一步确认。

(三)核酸检测

当前，使用耶氏肺孢子菌 DNA 扩增来诊断 PCP 已经越来越多地成为临床实验室的一种常规检测手段。尽管美国 FDA 还没有批准任何检测方法应用于临床[92]，但很多产品已通过 CE 认证，并且在美国以外的地区有售。随着实时 PCR 的出现，使用该方法诊断 PCP 比镜检方法和标准 PCR 或巢式 PCR 更加敏感和特异[93]。但是，尽管敏感性很高，使用此方法确诊需要和 PCP 的临床症状结合，因为该菌的定植也会被这种高敏感性的分析检测到[3]。通过检测与突变或耐药有关的特异基因(如二氢蝶酸合成酶)，PCR 可以用来鉴定潜在的耐药菌株或菌种[94]。尽管多种耶氏肺孢子菌基因型感染的重要性目前尚不明确，PCR 检测系统可检测单基因型或多基因型肺孢子菌。已有检测 PCP 的定量 PCR 或 TaqMan 探针测试(例如，Pneumocystis jirovecii Detection Kits，Norgen Biotek Corp.；RealStar Pneumo-cystis jirovecii PCR Kit，Altona Diagnostics，San Francisco，CA)，以及兼具检测 PCP 和 DHPS 突变能力的多重 PCR 检测试剂(PneumoGenius，PathoNostics，荷兰)；尽管在美国境外有几种已获 CE 认可，但没有一种在美国被批准用于临床。

PCR 自建方法检测耶氏肺孢子菌通常是针对线粒体 rRNA 核糖体大亚基(mtLSUrRNA)，内转录间隔区(internal transcribed spacer，ITS)或主要表面糖蛋白(major surface glycoprotein，MSG)基因组[95-96]。mtLSUrRNA 和 MSG 基因在每个微生物中有多重复制，因此，也是最为敏感的检测靶标。可使用商品化试剂盒如 PhaseLock System(Eppendorf Scientific，Westbury，NY)或厂家如 Qiagen(Valencia，CA)提供的一系列临床试剂从临床标本中提取 DNA。表 121-2 中列出了标准 PCR 需要的针对 mtLSUrRNA 的引物和 PCR 条件。

表 121-2 肺孢子菌的 PCR 检测方法:推荐的引物和反应条件

靶基因	引物	序列(5'-3')	预期产物大小(bp)	条件
mtLSUrRNA				
Primary[a]	pAZ102-E	GATGGCTGTTTCCAAGCCCA	346	94 ℃×1 min;
	pAZ102-H	GTGTACGTTGCAAAGTACTC		55 ℃×1 min;
				72 ℃×2 min;
				40 个循环;
				终止:72 ℃×5 min
Nested[b]	pAZ102-X	GTGAAATACAAATCGGACTAGG	267	94 ℃×1 min;
	pAZ102-Y	TCACTTAATATTAATTGGGGAGC		55 ℃×1 min;
				72 ℃×2 min;
				35 个循环;终止:72 ℃×5 min
DHPS[c]				
Round 1	F1	CCTGGTATTAAACCAGTTTTGCC		94 ℃×5 min;
	B_{45}	CAATTTAATAAATTTCTTTCCAAATAGCATC		92 ℃×30 s;
				52 ℃×30s;
				72 ℃×1 min;
				35 个循环;
				终止:72 ℃×5 min
Round 2	A_{HUM}	GCGCCTACACATATTATGGCCATTTTAAATC	300	94 ℃×5 min;
	BN	GCAACTTTCAACTTGGCAACCAC		92 ℃×30 s;
				52 ℃×30 s;
				72 ℃×1 min;
				35 个循环;
				终止:72 ℃×5 min

注:[a] 线粒体 rRNA 大亚基;参见参考文献[111]。[b] 参见参考文献[112]。[c] 二氢蝶酸合成酶基因;参见参考文献[30]和[113]

商业化的实时 PCR 分析 MycAssay Pneumocsts Kit(Myconostica Ltd. Cambridge, United Kingdom)被用来与直接免疫荧光镜检、检测耶氏肺孢子菌 *cdc*2 基因的实时 PCR 和直接检测 mtLSUrRNA 基因的传统 PCR 方法进行比较评估[93]。在使用 MycXtra 真菌 DNA 提取试剂盒(Myconostica)提取 DNA 之前,BALF 样品用 BD BBL MycoPrep(BD Diagnostics, BD)进行液化。该试剂盒包含所有需要的试剂,包括引物及靶向 mtLSUrRNA 的分子信标。如果循环阈值(CT)<39,测试结果为阳性;如果 CT 值≥39,没有指数扩增,则被认为是阴性。MycAssay 的效果优于其他所有方法,*cdc*2-实时 PCR 分析具有 100%的敏感性和 86%的特异性,mtLSUrRNA 传统 PCR 方法和测序分析则为 100%和 98.5%,而 MycAssay 对阳性和阴性的预测值为 100%。目前,MycAssay 在美国不用于诊断用途,但在美国以外可以使用。

另一个靶向多重扩增 MSG 基因的高灵敏且几乎全自动实时 PCR 分析仪来自于 BD MAX(BD Diagnostics Sparks, MD)[96]。在对呼吸道标本用二硫苏糖醇液化处理后,样本被装入提取管,然后仪器自动提取 DNA 或 RNA,并加入至 PCR 混合区,在此区 MSG 靶向基因、内标(Texas Red)和样本处理质控(Cy5)进行扩增。单次 PCR 质粒的检测限是 10 拷贝/ml,相当于 BALF 中的 500 拷贝,7~8 次运行后可以得到准确的定量结果。与对照 PCR 相比,这一全自动方法展示出了良好的定量相关性($R^2=0.82$)。该方法允许实现对 PCR 试剂进行预分装,允许在特定 PCR 区域之外使用整个系统,减少了交叉污染,且对操作人员的要求较低,减少了潜在的人为差错。与其他基于核酸的检测方法一样,BD Max 平台尚未获得 FDA 批准。此外,使用这些试剂盒需要结合临床情况进行评估,并谨慎使用。定植和感染的鉴别阈值仍是问题。在近期一项以 mtLSUrRNA 为靶

向基因的实时 PCR 研究显示，在区分定植和感染时，采用 1.6×10^3 拷贝/ml 的定植临界值及更高的 2×10^4 拷贝/ml 的感染临界值可以得到敏感性 100%和特异性 100%的结果。将该结果与 100 pg/ml 的 1,3-β-D-葡聚糖临界值结合，可以通过拷贝数鉴别 PCP 感染与定植[95]。

七、分离程序

利用人工培养基生长或组织培养来检测肺孢子菌不是一个有效的诊断选择，因为在肺孢子菌属中没有一种肺孢子菌能够在哺乳动物的肺部以外连续传代培养。

八、分型系统

目前还没有对耶氏肺孢子菌的分型系统形成共识。

九、血清学试验

检测抗耶氏肺孢子菌抗体的血清学分析对流行病学研究是有帮助的，但不可用于 PCP 的诊断。大部分人在童年早期，2～4 岁时就耶氏肺孢子菌抗体呈血清学阳性，而他们在之后漫长的生命中可能会多次接触到该微生物。在某些案例中，部分 PCP 患者随着时间的推移可以检测到抗体浓度的升高，但在其他患者身上，抗体浓度往往会下降或保持不变。

有许多其他实验室测试可以帮助诊断 PCP，但都不能提供确切的诊断。这些测试包括肺泡动脉血氧梯度升高，血清中乳酸脱氢酶水平的上升，以及镓(gallium)和二乙烯三胺五乙酸(diethylenetriamine pentaacetic)扫描(译者按：即影像学中 PET-MR 的造影检查)。后 2 种测试因为成本较高，不作为常规使用。也有报道表明还原 S 腺苷甲硫氨酸(reduced sadenosylmethionine, AdoMet)水平降低能够反映 PCP 感染[97-99]，但另一篇研究评估了 AdoMet 和 1,3-β-D-葡聚糖水平的诊断效用，发现 AdoMet 的水平不能区分感染患者和非感染患者，而 1,3-β-D-葡聚糖以 60 pg/ml 为临界值时具有较高的敏感性和特异性[100]。

十、抗菌药物敏感性

急性 PCP 的治疗通常包括 2 种药物，复方磺胺甲噁唑和羟乙磺酸喷他脒(pentamidine isethionate)[66]。对于症状较轻的患者，使用二线药物如阿托伐醌(atovaquone)和克林霉素-伯氨喹(clindamycin-primaquine)进行治疗，对于某些患者还可以使用皮质类固醇(corticosteroids)以提高治疗效果。但是，使用二线药物治疗时，有相当一部分比例的患者出现了复发或反复发作的情况[101]。

最初的治疗方法主要取决于氧合水平和(或)A-a 梯度。轻度疾病分类为 A-a 梯度为<35 mmHg 和(或)动脉血氧分压>70 mmHg 的患者。在这些患者中，建议口服治疗。中度疾病患者的 A-a 梯度为>35 mmHg 和<45 mmHg 和(或)动脉血氧分压为>60 mmHg 和<70 mmHg。在这些患者中，除非口服吸收存在问题，否则也建议口服治疗。严重疾病是指患者的 A-a 梯度为>45 mmHg 和(或)氧分压<60 mmHg。在此类别中，患者应接受静脉治疗直至临床稳定(例如，氧气分压>60 mmHg，呼吸频率<25)，然后可以过渡为口服治疗。

复方磺胺甲噁唑是靶向氨基酸二氢叶酸还原酶(甲氧苄氨嘧啶)和二氢蝶酸合成酶(磺胺噁恶唑)的复合药物，这 2 种酶都是叶酸通路的重要步骤。复方磺胺甲噁唑标准的用药剂量是 15～20 mg/kg，每天 3～4 次静脉滴注或口服。类固醇对中度到重度 PCP 感染的 HIV 患者是一种重要的辅助药物。使用该药物可以降低有害的炎症反应。通常在前 5～7 天给予较高剂量的类固醇，随后减少剂量并继续用药 2 周。可以在使用抗生素时加用类固醇，也可以在抗生素治疗结束前停止用药。对 PCP 预防用药的第一选择依然是复方磺胺甲噁唑，每天 1 次或每周 3 次，每次 960 mg[102]。如果患者对复方磺胺甲噁唑不耐受，推荐口服氨苯砜(100 mg/d)、吸入雾化喷他脒(300 mg/4 周)或口服阿托伐醌(至少 1500 mg/d)。

喷他脒是一种阳离子二脒，最早被用来治疗非洲锥虫病或昏睡症，后来才发现其对 PCP 有疗效。该药物的作用机制尚不明确，但可能包括抑制线粒体活性，抑制局部异构酶或是与 DNA 小沟区结合[103]。喷他脒和复方磺胺甲噁唑具有强烈

的不良反应如肾毒性，复方磺胺甲噁唑还会引起严重的皮疹、发热和嗜中性白细胞减少症，这些严重不良反应发生后需要更改治疗方案。近期一项对初次感染 PCP 的 HIV-1 型感染患者的研究表明，只有 64％的患者完整接受了复方磺胺甲噁唑的治疗方案[104]。该药物并不是肺孢子菌专用的。喷他脒用药时通过雾化的方式，将药物有效地送至感染部位，但在治疗 PCP 及其他呼吸道病原体与耶氏肺孢子菌共同感染时，不如其他药物有效。

PCP 对大多数常见的抗真菌药物如三唑类或两性霉素 B 都耐药。棘白菌素类药物是 1,3-β-D-葡聚糖的抑制剂，是一类相对较新的抗真菌药物，可以有效消除念珠菌感染和抑制曲霉菌感染[105]。利用棘白菌素治疗 PCP 的报道有些矛盾，因为这些报道很大一部分不是非常严谨[106-107]。已上市的 3 种临床可用的棘白菌素类药物卡泊芬净(caspofungin)、阿尼芬净(anidulafungin)和米卡芬净(micafungin)对啮齿类动物 PCP 的系统性研究结果表明，这些药物能有效降低包囊的数量，但是对营养型效果不佳，说明单一治疗无法取得有效成果，但是可以和复方磺胺甲噁唑联合使用，对某些患者可能会取得良好的效果[18]。

在某些区域，约 50％的 PCP 分离株检测出耶氏肺孢子菌的 DHPS 基因突变，这种突变与其他病原菌对磺胺类药物耐药相关[108]。这一突变的现象可能与前期的复方磺胺甲噁唑治疗有关，但突变对治疗结局和治疗反应的影响目前尚不明确。

因此，人们在未来需要追踪对复方磺胺甲噁唑耐药的耶氏肺孢子菌，以及评估可能的治疗方案。为了实现这一目标，表 121-2 中列举了其他病原菌对磺胺类耐药时靶向 DHPS 基因区域的引物。核苷酸(nt)发生突变的位置在 nt 165 和 nt 171 处，改变这些核苷酸的位置意味着改变了氨基酸。这种靶点基因的 4 种基因型为：基因 1 型，nt165(A)/nt171(C)＝Thr/Pro；基因 2 型，nt165(G)/nt171(C)＝Ala/Pro；基因 3 型，nt165(A)/nt171(T)＝Thr/Ser；基因 4 型，nt165(G)/nt171(T)＝Ala/Ser。最后一种基因型，GT，表示 DHPS 基因的双突变，与耐药性密切相关，而且在某些地区已经成为主要的基因型。尽管 PCP 对阿托伐醌的耐药性与线粒体细胞色素 b1 基因的突变[109]有关，但对复方磺胺甲噁唑的耐药更加棘手，检测 DHPS 基因突变，应在辅助临床状态评估时，起到重要作用[110]。

十一、结果的评价、解释和报告

通过六亚甲基四胺银染色或快速改良瑞吉染色，IFA 或其他如 Papanicolaou 染色技术，在组织或液体中镜检观察到耶氏肺孢子菌应当足以确诊。在很多病例中，真菌显示为大块的微生物的聚集，因此根据瑞吉染色或 Papanicolaou 染色可能难以在密集的聚集体中区分生命循环的阶段。因此，建议采用仅使肺孢子菌的包囊型可见的染色方式(如 Gomori 六亚甲基四胺银)，因为这样更容易对结果进行解释。快速染色可以作为初期筛查的一种方式，随后应当进行特定的包囊染色。IFA 对于不熟悉耶氏肺孢子菌形态学的实验室较有帮助，但这需要荧光显微镜，不是所有的实验室都具备这一条件。IFA 的结果依赖于单克隆抗体的靶标。某些试剂盒使用的单克隆抗体靶向所有生命循环阶段的表面糖蛋白，但它们也会使耶氏肺孢子菌嵌入的基质染色，造成大面积的荧光效果，观察不到细节。因目前已知没有其他种的肺孢子菌会引起人类肺炎，这些真菌的存在可以报告为耶氏肺孢子菌或肺孢子菌某种。“卡氏肺孢子菌”这一名称不应当再被使用，因为这种真菌感染的是大鼠。基于镜检方法发现耶氏肺孢子菌，以及根据患者的临床评估就可以开始治疗。中度到重度感染的 PCP 患者应当静注复方磺胺甲噁唑、克林霉素/伯氨喹或喷他脒并联合使用皮质类固醇。轻度到中度感染的 PCP 患者应当用复方磺胺甲噁唑、甲氧苄啶-氨苯砜、喷他脒、阿托伐醌或克林霉素/伯氨喹治疗[62]。

参考文献请扫二维码查阅

第122章 曲霉属、篮状菌属和青霉属

SHARON C.-A. CHEN, WIELAND MEYER, TANIA C. SORRELL, CATRIONA L. HALLIDAY

(陈中举 译;吴文娟、陆玲 审校)

一、曲霉属

(一)分类学

曲霉属(*Aspergillus*)在分类学中属子囊菌门(Ascomycota)、发菌科(Trichomaceae)。分类学研究显示，目前已发现的曲霉属菌种超过350个[1-2](http://www.aspergilluspenicillium.org)。多数菌种(64%)为无性繁殖[3]，狭义的曲霉属(*Aspergillus sensu stricto*)无性型与狭义的青霉属(*Penicillium sensu stricto*)无性型及拟青霉属(*Paecilomyces*)在系统发生学上有关系[4]。

Raper和Fennell在1965年首次将曲霉属的132个种归类于18个亚群[亮白曲霉(*Aspergillus candidus*)、棒曲霉(*A. clavatus*)、鹿皮色曲霉(*A. cervinus*)、淡黄曲霉(*A. cremeus*)、黄柄曲霉(*A. flavipes*)、黄曲霉(*A. flavus*)、烟曲霉(*A. fumigatus*)、灰绿曲霉(*A. glaucus*)、构巢曲霉(*A. nidulans*)、黑曲霉(*A. niger*)、赭曲霉(*A. ochraceus*)、华丽曲霉(*A. ornatus*)、局限曲霉(*A. restrictus*)、稀疏曲霉(*A. sparsus*)、土曲霉(*A. terreus*)、焦曲霉(*A. ustus*)、杂色曲霉(*A. versicolor*)和温特曲霉(*A. wentii*)]和18个基于形态学特征划分的变种[5]。然而随着分子系统发生学的进展，菌种的分类学发生了改变，出现了新的亚门、亚属和组[1-2]。采用基于4个基因位点:①β-微管蛋白基因;②钙调蛋白基因;③rDNA基因簇的内转录间隔区(internal transcribed spacer,ITS)和大亚基;④RNA聚合酶Ⅱ2(RPB2)的多基因法的系统发生学研究，Peterson确定了5个亚属[曲霉亚属(*Aspergillus*)、环绕亚属(*Circumdati*)、烟色亚属(*Fumigati*)、巢状亚属(*Nidulantes*)和华丽亚属(*Ornati*)]，这5个亚属又分为16个组[曲霉组(*Aspergillus*)、亮白组(*Candidi*)、鹿皮色组(*Cervini*)、棒状组(*Clavati*)、环绕组(*Circumdati*)、*Cremei*组、黄色组(*Falvi*)、黄柄组(*Flavipedes*)、烟色组(*Fumigati*)、构巢组(*Nidulantes*)、黑色组(*Nigri*)、局限组(*Restricti*)、稀疏组(*Sparsi*)、土生组(*Terrei*)、焦色组(*Usti*)和杂色组(*Versicolores*)]，既保留了前期确定的组，又对其进行了重新的分类[6]。重新分类也导致了属内一系列重要的变化，例如，目前有些特定的群包含了具有单层和双层瓶梗的不同菌种，也可能包含菌落颜色特点有差异的不同菌种。新的分类方法与前期的分类方法有所不同，以前对不同群的曲霉主要依据表型特征如菌落的颜色进行区分。这种多相的菌种系统发生学概念的应用，可使我们在最常见的病原体中发现新的隐形种或亲缘种，如迟缓曲霉(*A. lentulus*)[7]和阿拉巴马曲霉(*A. alabamensis*)[8]。最近一次分类学修订中，Samson等[1]、Chen等[2]和Kocsube等[9]将Peterson[6]的分类工作做了拓展，将超过350个曲霉属菌种分类于8个亚属[曲霉亚属(*Aspergillus*)、烟色亚属(*Fumigati*)、环绕亚属(*Circumdati*)、亮白亚属(*Candidi*)、土生亚属(*Terrei*)、巢状亚属(*Nidulantes*)、Warcupi亚属和华丽亚属(*Ornati*)]，这些亚属可再分为组或种复合群。

基于序列分析的分子工作建立了曲霉(相关菌种)的无性型和有性型之间的关系，而不依赖于其是否发生了有性繁殖。截至本文撰写时，曲霉属中的无性型菌种与10类有性型菌属相关[*Cristaspora*、半萨托亚属(*Hemisartorya*)、裸孢壳属(*Emericella*)、散囊菌属(*Eurotium*)、芬尼菌属(*Fennellia*)、新坚壁曲霉属(*Neocarpenteles*)、新石座菌属(*Neopetromyces*)、新萨托亚属(*Neosar-

torya)、石座菌属(*Petromyces*)和(*Saitoa*)],这10类菌属均属于发菌科[9]。Peterson[6]曾建议对曲霉属的分类可依据与独特谱系相关的有性阶段来制订,但这会弱化与曲霉属相关的最常见的形态特征。2011年于澳大利亚墨尔本举行的国际植物学大会在《国际藻类、真菌和植物命名法规》[10]中新制定了"一种真菌一个名字"的命名原则,且取消了对真菌有性型优先命名的原则[11],这使得曲霉属菌种的命名一直存在争论。2012年国际人类和动物真菌学学会(International Society for Human and Animal Mycology,ISHAM)曲霉工作组同意保留曲霉属的命名,不再采用有性型的命名(*sensu* Raper and Fennell[5])而采用"广义曲霉属"的概念,这一决定具有非常重大的意义,因其使我们熟知的有性型菌属名称[裸孢壳属(*Emericella*)、散囊菌属(*Eurotium*)、新萨托亚属(*Neosartorya*)]不再被沿用。保留整个曲霉属名称的观点可保证大多数医学上重要的曲霉命名及其临床解释的稳定性。另一方面,Pitt和Taylor[12]遵循Peterson[6]的建议,采用一种基于有性型的命名方法(即"狭义曲霉属"的概念),这将为一个小的分组或相关菌种保留于该菌属,并考虑到这些菌种在形态上的差异,提供更为一致的分类方法。该方法使单系的、具有精确形态和生理特征的菌属获得更好的分类一致性[13]。目前,对是否使用无性型对全部该菌属命名("side *Aspergillus*"的概念)或根据有性型将该菌属拆分(即"狭义曲霉属"的概念)的讨论还在持续。本章遵循当前国际青霉菌和曲霉菌委员会的官方观点,使用无性型名称,并将有性型名称添加在其后的括号内(http://www.aspergilluspenicillium.org)。

已知的曲霉中,引起人类感染最主要的菌种是烟曲霉(有性型名称:烟色新萨托亚菌 *Neosartorya fumigata*),其次是黄曲霉(有性型名称:黄色石座菌 *Petromyces flavus*)、土曲霉和黑曲霉。此外,至少还有48种曲霉可引起疾病[14]。表122-1中所列曲霉虽较少见,但很重要,其中大部分曲霉的系统发生关系见图122-1,这是使用ITS1和ITS2 rDNA序列分析得出的结果。

表122-1 已知不常见的致病性曲霉

无性型名称	有性型名称
酸曲霉 *Aspergillus acidus*	
棘孢曲霉 *A. aculeatu*	
阿拉巴马曲霉 *A. alabamensis*	
洋葱曲霉 *A. alliaceus*	洋葱石座菌 *Petromyces alliaceus*
燕麦曲霉 *A. avenaceus*	
巴西曲霉 *A. brasiliensis*	
A. caesiellus	
A. calidoustus	
亮白曲霉 *A. candidus*	
肉色曲霉 *A. carneus*	
谢瓦利埃曲霉 *A. chevalieri*	谢瓦利埃散囊菌 *Eurotium chevalieri*
矮棒曲霉 *A. clavato-nanicus*	
棒曲霉 *A. clavatus*	
圆锥曲霉 *A. conicus*	
弯头曲霉 *A. deflectus*	
费希尔曲霉 *A. fischeri*(以前为 *A. fischerianus*)	费希尔新萨托亚菌 *Neosartorya fischeri*
黄柄曲霉 *A. flavipes*	黄柄芬尼菌 *Fennellia flavipes*
似烟曲霉 *A. fumigatiaffinis*	
烟束曲霉 *A. fumisynnematus*	
灰绿曲霉 *A. glaucus*	蜡叶散囊菌 *Eurotium herbariorum*

（续 表）

无性型名称	有性型名称
细粒曲霉 *A. granulosus*	
蒙得维的亚曲霉 *A. montevidensis*（以前为 *A. hollandicus*）	阿姆斯特丹散囊菌 *Eurotium amstelodami* 两形头曲霉 *A. janus*
日本曲霉 *A. japonicas*	
迟缓曲霉 *A. lentulus*	
构巢曲霉 *A. nidulans*	构巢裸孢壳 *Emericella nidulans*
雪白曲霉 *A. niveus*	雪白芬尼菌 *Fennellia nivea*
红绶曲霉 *A. nomius*	红绶石座菌 *Petromyces nomius*
A. ochraceopetaliformis	
赭曲霉 *A. ochraceus*	
米曲霉 *A. oryzae*	
寄生曲霉 *A. parasiticus*	
青霉状曲霉 *A. penicilloides*	
A. persii	
假灰绿曲霉 *A. pseudoglaucus*（以前为 *A. reptans*）	匍匐散囊菌 *Eurotium repens*
局限曲霉 *A. restrictus*	
细皱曲霉 *A. rugulosus*（以前为 *A. rubrobrunneus*）	褶皱裸胞壳 *Emericella rugulosa*
菌核曲霉 *A. sclerotiorum*	
聚多曲霉 *A. sydowii*	
溜曲霉 *A. tamari*	
四脊曲霉 *A. quadrilineatus*（以前为 *A. tetrazonus*）	四脊裸孢壳 *Emericella quadrilineata*
刺孢曲霉 *A. spinosus*	刺孢新萨托亚菌 *Neosartorya spinosa*
A. thermomutatus	假费希尔新萨托亚菌 *Neosartorya pseudofischeri*
小麦曲霉 *A. tritici*	
图宾根曲霉 *A. tubingensis*	
宇田川曲霉 *A. udagawae*	宇田川新萨托亚菌 *Neosartorya udagawae*
爪甲曲霉 *A. unguis*	爪型裸孢壳 *Emericella unguis*
焦曲霉 *A. ustus*	
杂色曲霉 *A. versicolor*	
绿垂曲霉 *A. viridinutans*	

(二)病原体的描述

曲霉广泛存在于自然界，其在真菌培养基上生长迅速，形成粉末状的菌落。不同种类有不同的菌落颜色，并受生长条件和其他因素的影响，例如，是否存在营养菌丝、分生孢子头和(或)有性结构。在菌落颜色上，暴露于空气中的部分可能与生长于培养基中的部分不同。

曲霉的生长速度、培养基中特定生长阶段的菌落直径及菌落边缘的形态对菌种的鉴定有重要的作用。菌落边缘可锐利，或逐渐变薄，可整体光滑或不规则开裂，可深入培养基中或在表面气生。菌落表面质地为天鹅绒状、絮状或颗粒状，可呈条带状，这些都有助于菌种的鉴定[14]（见“鉴定”）。

曲霉形成不分隔的菌柄或分生孢子梗（细胞壁），末端通常有顶囊（明显膨大的部分），其上可同步形成瓶梗。在瓶梗末端形成链状的分生孢子，曲霉通过分生孢子进行繁殖。瓶梗可由顶囊直接产生（单层瓶梗），也可由梗基（中间的一系列细胞）产生（双层瓶梗）[14]。曲霉重要的结构特征示意图如图 122-2 所示，临床相关菌组/种形态特征见表 122-2。

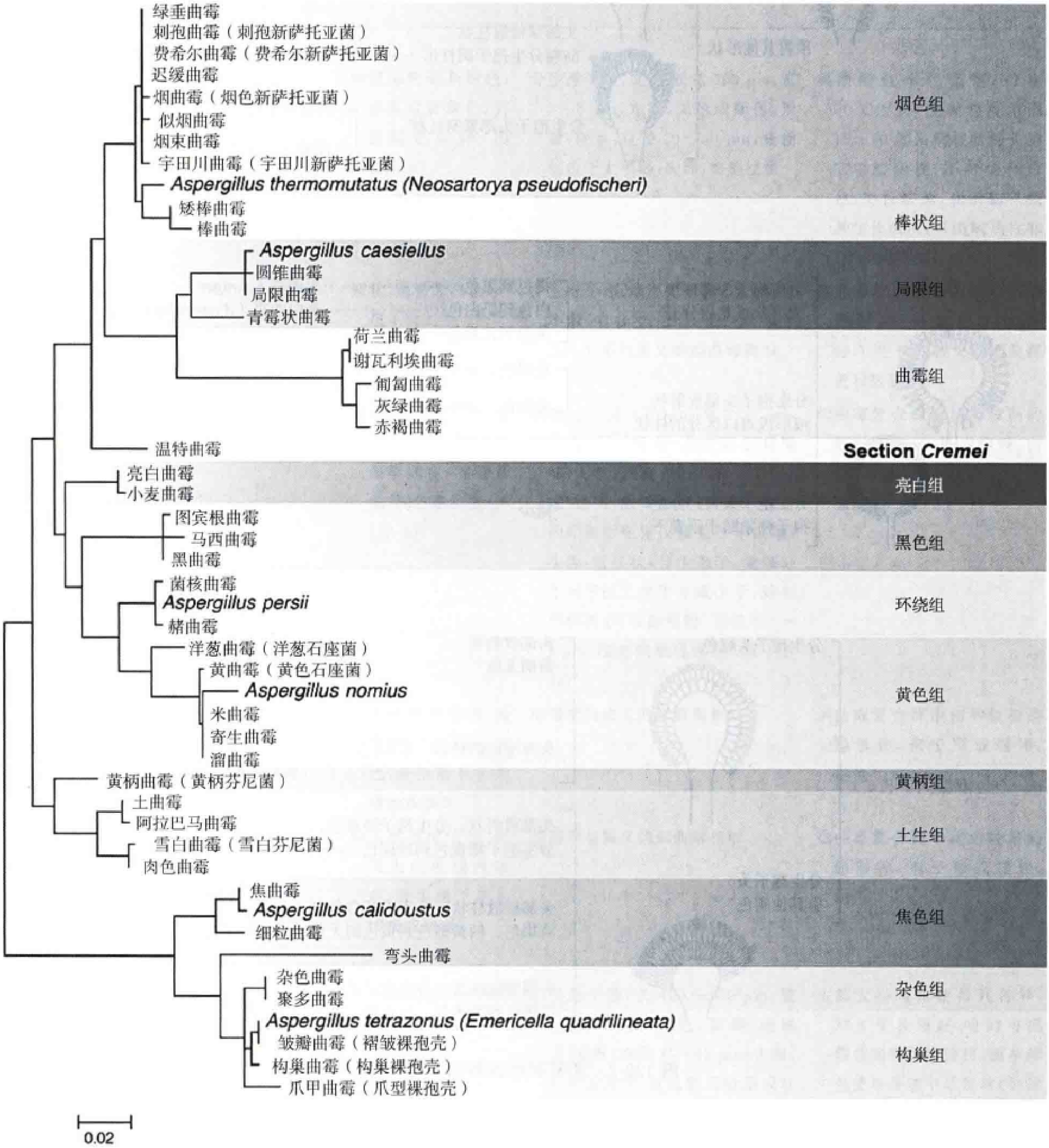


图 122-1 最大似然法构建的病原性曲霉菌种的系统发生树，根据临床真菌学图谱（*Atlas of Clinical Fungi*）4.1 版本（http://www.clinicalfungi.org），基于从 GenBank 获取的 rDNA 内转录间隔区（ITS）1 和 ITS2 的序列，使用程序 MEGA ver. 7.0 进行分析。括号内为有性型名称，见彩插

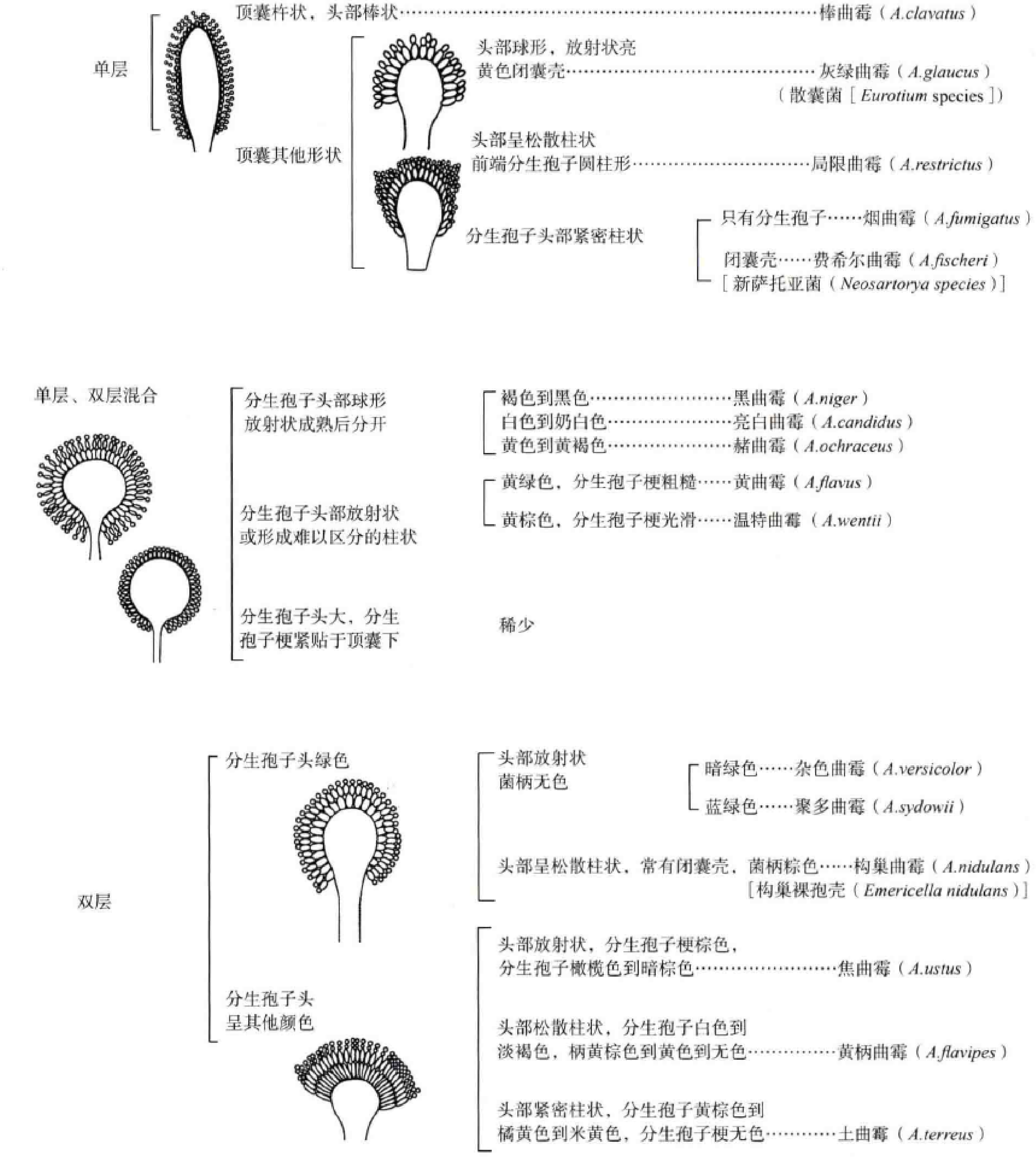


图 122-2 曲霉属代表种的关键特征

(三)流行病学与传播

曲霉属于环境腐生菌，从腐烂的植物中获取营养，易分离自土壤、水、某些植物和空气。尽管环境中的曲霉孢子可被人体不断吸入，但其最终会被健康宿主的黏膜纤毛清除，或被肺泡巨噬细胞吞噬[15]，若宿主存在肺功能改变，如囊性纤维化患者，曲霉孢子可能会定植在呼吸道，亦可能引起过敏性或侵袭性肺疾病。严重免疫功能低下的人群有患侵袭性肺曲霉病的高危风险，此外，肺部曲霉感染灶还可扩散到附近部位或通过血流播散到体内其他部位[16-17]。

曲霉可存在于卫生和医疗设施中，例如，未经过滤的空气、通风系统、灰尘、食品、医院的供水和

表 122-2 临床重要的曲霉种在鉴定培养基上生长的特点

组[a]和种名	瓶梗排列		菌落颜色	镜下特性[b]	注释[c]
	单列	双列			
烟色组(*Fumigati*)					
狭义的烟曲霉(*Aspergillus fumigatus sensu stricto*)[有性型:烟色新萨托亚菌(*Neosartorya fumigata*)]	+		暗蓝绿色到灰绿色;成熟后青灰色;背面颜色各异(图 122-3b)	分生孢子梗:直立,长达 300 μm,宽 5~8 μm,光滑,无色或绿色;顶囊:拱形,直径 20~30 μm,瓶梗仅位于上半部;头部:典型柱状	典型的蓝绿色菌落,可在 50 ℃生长(生长温度范围 15~50 ℃);圆柱状的头部有单层瓶梗;不育变种白色,生长快速,光滑脑状变种生长缓慢,可由耐热性和 DNA 测序加以验证
猫曲霉(*A. felis*)	+/−		絮状,通常为白色,产孢不良	分生孢子:近球形到球形,光滑到有小棘,直径 2~3.5 μm(图 122-3c),形态与狭义的烟曲霉类似	烟曲霉复合群中相对较新的隐形种,可通过不能在 50 ℃生长与狭义的烟曲霉进行区别
迟缓曲霉(*A. lentulus*)	+		绒毛状到棉毛状,通常为白色,灰绿色菌落散在;背面黄色,无色素扩散(图 122-3d)	菌柄:长 250~300μm,宽 2~7 μm,光滑,有时弯曲,常在颈部有缩窄,无色;顶囊:较小,8~10 μm 宽,透明,似棒形或近球形,较少的短瓶形瓶梗仅覆盖一半区域;头部:短柱状;分生孢子:每条分生孢子链上少于 6 或 7 个,球形到椭圆形,表面粗糙,直径 2.5~3 μm,浅蓝到橄榄绿色(图 122-3e)	烟曲霉复合群中相对较新的隐形种,孢子形成缓慢,白色;不能在 50 ℃生长(生长温度 10~45℃)
A. thermomutatus [有性型:假费希尔新萨托亚菌(*N. pseudofischeri*)]	+		绒毛状到棉毛状,通常为白色到浅黄色,分生孢子生长缓慢或缺乏	形态学与狭义的烟曲霉相似	烟曲霉复合群中相对较新的隐形种,孢子形成缓慢,白色
宇田川曲霉(*A. udagawae*)(有性型:宇田川新萨托亚菌 *N. udagawae*)	+		绒毛状到棉毛状,通常为白色到浅黄色,分生孢子生长缓慢或缺乏	形态学与狭义的烟曲霉相似	烟曲霉复合群中相对较新的隐形种,孢子形成缓慢,白色
黄色组(*Flavi*)					
黄曲霉(*A. flavus*)[有性型:黄色石座菌(*Petromyces flavus*)]	+	+	黄色到暗黄绿色(图 122-3f)	分生孢子梗:长 400~850 μm,宽 20 μm,粗糙,无色;顶囊:近球形/球形,直径 25~45 μm;头部:松散放射状,或成熟后分裂成柱状(图 122-3g);分生孢子:球形到椭圆形,粗糙,直径 3~6 μm	头部大小与瓶梗排列各异,37 ℃生长较好,有时可见棕色到黑色的菌核,菌落颜色受培养基中添加物(如酵母提取物)的影响。产毒素
黄柄组(*Flavipedes*)					
黄柄曲霉(*A. flavipes*)[有性型:黄柄芬尼菌(*Fennellia flavipes*)]		+	菌落白色,点缀有黄色或浅灰黄色;背面黄色到金棕色	分生孢子梗:长 150~400 μm,宽 4~8 μm,光滑到粗糙,无色到浅棕色;顶囊:近球形,直径 10~290 μm;头部:放射状到松散柱状;分生孢子:球形,光滑,直径 2~3 μm;闭囊壳和壳细胞少见	菌落生长缓慢,可与土曲霉相鉴别,梗基形成于顶囊整个表面,放射状至松散的柱状头部

（续 表）

组[a]和种名	瓶梗排列		菌落颜色	镜下特性[b]	注释[c]
	单列	双列			
构巢组(*Nidulantes*)					
构巢曲霉(*A. nidulans*)［有性型:构巢裸胞壳(*Emericella nidulans*)］		+	若主要为分生孢子，则为暗绿色；如存在闭囊壳则为浅黄色至略带棕紫色；背面：深红到紫色	分生孢子梗：长70～150 μm，宽3～6 μm，光滑，棕色；顶囊：半球形，直径8～12 μm；头部：瓶梗生于上半部，柱状；分生孢子：球形，粗糙，直径3～4 μm；闭囊壳红棕色，球形，100～250 μm（图122-3h）；壳细胞球形；子囊孢子扁豆状。具有2个约5 μm长纵向脊突，紫红色；分生孢子头部，子囊果和壳细胞与构巢裸胞壳相似。子囊孢子也与之相似，但有2大和2小赤道样脊突	典型的红棕色闭囊壳，大量壳细胞，紫红色子囊孢子（有2个脊突），分生孢子和梗基较短；产毒素
四脊曲霉(*A. quadrilineatus*)［有性型:四脊裸孢壳(*Emericella quadrilineata*)］		+	橄榄绿或浅灰紫色；背面紫色		与构巢裸胞壳的区别为子囊孢子有4个赤道样脊突
黑色组(*Nigri*)					
黑曲霉(*A. niger*)		+	黑色伴白色边缘，表面菌丝黄色；背面无色或淡黄色	分生孢子梗：长400～3000 μm，宽15～20 μm，光滑，靠近顶部无色或褐色；顶囊：球形，直径30～75 μm；头部：放射状，成熟后分裂为柱状；分生孢子：厚壁，球形，黑褐色，粗糙，直径4～5 μm	常引起耳真菌病，有时定植于内腔，尤其是糖尿病患者
图宾根曲霉(*A. tubingensis*)		+/－	分生孢子头处于暗黑棕色背景，分生孢子梗长；背面白色	分生孢子梗：长2～3 mm，光滑宽大，直径15～20 μm；分生孢子头：球状到放射状，直径大多200～300 μm，分生孢子：球形直径3.0～3.5 μm，逐渐变得更黑、更粗糙；一些菌株产生菌核，球形到半球形、奶酪色，随着生长变为粉红色，有时变暗甚至全部黑色，直径通常为500～800 μm	缓慢产孢，白色。通常与肺部疾病和耳真菌病有关。可通过 *benA* 或 *CaM* 基因序列与黑色组的其他曲霉进行区别
土生组(*Terrei*)					
土曲霉(*A. terreus*)		+	黄褐色到肉桂色	分生孢子梗：长100～150 μm，宽4.5～6 μm，光滑，无色；顶囊：拱形，直径10～16 μm，瓶梗位于上半部；头部：柱状；分生孢子：球形/近球形，光滑，直径2 μm，常在基质菌丝上形成固着的单孢分生孢子	分辨特征：肉桂色菌落，柱状头部，固着的单孢分生孢子；对两性霉素B常耐药
焦色组(*Usti*)					
焦曲霉(*A. ustus*)		+	灰褐色或橄榄灰；背面黄色，暗红色或浅紫色	分生孢子梗：长75～400 μm，宽4～7 μm，光滑，渐变为棕色；顶囊：球形/近球形，直径7～16 μm，瓶梗分布于上2/3；头部：放射状到松散柱状；分生孢子：球形，粗糙，直径3～4.5 μm；常有不规则壳细胞（图122-3i）	若存在壳细胞，则其为分辨特征。棕色分生孢子梗

（续 表）

组[a]和种名	瓶梗排列		菌落颜色	镜下特性[b]	注释[c]
	单列	双列			
弯头曲霉（*A. deflectus*）		+	生长缓慢。鼠灰色，略带粉红色的边缘或缀有黄色	分生孢子梗：长 40～125 μm，宽 2.5～3.5 μm，光滑，红棕色；顶囊：半球形，直径 5～7 μm，弯曲后与菌柄成直角；头部：瓶梗在靠上部分，柱状；分生孢子：球形，直径 3～3.5 μm，光滑到粗糙；壳细胞有时存在	顶囊弯曲后与菌柄成直角是鉴别特征。很少对人类致病
杂色组（*Versicolores*）					
杂色曲霉（*A. versicolor*）		+	绿色/灰绿色或黄褐色伴粉色或黄色点缀；背面颜色多变，常深红色	顶囊：卵形到椭圆形，直径 9～16 μm；头部：放射状到松散柱状；分生孢子：球形，有小棘，直径 2.5～3 μm；壳细胞球状	生长缓慢，绿褐色或颜色多变的菌落，小的双层顶囊
不常见病原菌					
曲霉组（*Aspergillus*）					
灰绿曲霉（*A. glaucus*）[有性型：蜡叶散囊菌（*Eurotium herbariorum*）和其他菌属]	+		深绿色和亮黄色夹杂；背面无色或浅黄色	分生孢子梗：长 200～300 μm，宽 7～12 μm，光滑，无色到浅褐色；顶囊：球形，直径 15～30 μm；头部：大、放射状；分生孢子：近球形，有小棘，直径 5 μm；闭囊壳：壁薄，黄色，球形，子囊孢子 75～150 μm，光滑或粗糙，有沟状和环绕或皱的突起	之前称为灰绿曲霉群；耐高渗；高糖培养基促繁殖；37 ℃生长较差；通过分生孢子头很难鉴定到种，但可由子囊孢子的形态进行鉴定；组成包括 *E. umbrosus*，*E. ruber*，*E. repens*；*E. umbrosus* 可引起农民肺（无性型为灰绿曲霉）
局限组（*Restricti*）					
局限曲霉（*A. restrictus*）	+		单调的橄榄绿到轻微的绿褐色，生长极为缓慢	分生孢子梗：80～200 μm，宽 4～8 μm，光滑或粗糙，无色；顶囊：半球形，直径 8～20 μm；头部：瓶梗位于上 1/3，柱状；分生孢子：圆柱形到椭圆形，粗糙，长 4～7 μm，宽 3～4 μm	易于烟曲霉混淆，但不同的是在常规培养基上生长极慢，高糖培养基上生长稍快，37 ℃不生长，形成长的、附着的圆柱形分生孢子
亮白组（*Candidi*）					
亮白曲霉（*A. candidus*）	+	+	白色或奶白色	分生孢子梗：大多长 200～500 μm，宽 7～10 μm，光滑到粗糙，无色；顶囊：球形或近球形，直径 17～35 μm；头部：瓶梗覆盖整个表面，放射状； 分生孢子：球形，光滑，直径 3～4 μm；菌核：有时产生微红紫色菌核	通过其白色和缓慢生长的菌落与其他产色的曲霉相区别；但需注意的是，烟曲霉复合群中也有白色菌落、生长缓慢和产孢缺陷的菌种

注：[a] 现代概念中已用亚属和组代替了“群”；[b] 参见上文“分类学”部分的阐述；[c] 只有产生强力毒素的菌种才标注“产毒素”，但其他菌种也可能产生少量毒素

包括淋浴点等潮湿的环境中[18-20]。在已报道的多起暴发性医院获得性侵袭性感染中，多数是由于患者吸入因建筑或拆除活动暴露的曲霉气生孢子引起[21-22]，也可源于污染源或其表面的水分形成的气溶胶[19-20,23]。尽管水作为医院暴发感染源的重要性尚不确定，但 Warris 和 Verweij[23] 提出了在医院控制水源性感染的预防措施。大多数的暴发会引起侵袭性肺曲霉病，引起手术伤口和皮肤感染的暴发也有报道[24]。一些研究中，感染常见的来源可用分子基因分型来确定[18,21]，除了克隆的相关基因型和微变种的存在，临床和环境样本中也发现了多种有代表性的基因型[25]。并非所有研究都显示出了环境和临床分离株的遗传相关性[23]。在一次疫情暴发的调查中发现，患者护理区空气中的孢子浓度为 0 到多于 100 个/m^3。虽然空气中较高的孢子浓度与暴发具有相关性[25]，但低于某个浓度可认为是安全的阈值并未确定。由于不同采样方法的使用、孢子计数的快速变化、暴露后临床表现延迟而导致采样的延迟、宿主易感性的差异及其他因素的影响，或许不能确定这个阈值[18]。在一个长达 10 年的空气样本中曲霉菌流行率的研究中，Falvey 和 Streifel 得出的结论为：虽然一个短暂的曲霉菌浓度高峰可能预示着存在潜在的内部污染源，但常规的空气采样不是预测医院获得性感染的有效方法[26]。疾病预防和控制中心(CDC)与美国医院感染控制顾问委员会(HICPAC)针对卫生保健机构曲霉病的预防发布了指南[22]。

烟曲霉是发达和发展中国家引起侵袭性曲霉病的最主要病原菌，至少占曲霉类的 65%，尤其在高危人群中及血液系统恶性肿瘤患者中[27-30]。其他致病真菌种类包括黄曲霉、土曲霉和黑曲霉复合群，以及不常见的构巢曲霉和焦曲霉[31-33]。黄曲霉感染在发展中国家和干旱地区更常见，主要引起过敏性曲霉病、创伤性眼内炎，以及鼻-眶-颅底曲霉感染[28,34-35]，而在其他地区，土曲霉可能是最常见的菌种[36]。院内暴发的曲霉病在血液系统肿瘤患者中最常见，常由烟曲霉或黄曲霉引起[19,21]。美国移植相关感染监测网(TRANSNET)分析了 2001－2006 年间的数据，67%的分离株为烟曲霉，烟曲霉的隐形种占烟曲霉复合群的 6%[30]。

(四)临床意义

曲霉能释放真菌毒素或其他代谢产物导致疾病(第 129 章)，也可直接在创伤皮肤、眼睛或其他部位繁殖，抑或因吸入孢子造成过敏或侵袭性疾病，感染也可影响耳部，引起耳真菌病。曲霉最常侵袭肺部，也可因初次感染后持续扩散或播散到几乎所有的器官[37]。肺部感染是曲霉病的一种类型，其取决于机体免疫抑制的程度、遗传因素和呼吸系统结构是否存在异常。特定的菌种与特定的疾病类型间存在关联(表 122-3)。

侵袭性曲霉病在常见的医院获得性真菌感染中排名第 2 位，仅次于侵袭性念珠菌病[38]，在血液系统恶性肿瘤、异基因干细胞移植或肺移植患者中可导致高发病率和死亡率[39-40]，还包括接受心脏、肝脏或肾脏移植(较少见)的患者、接受英夫利昔单抗或肿瘤坏死因子-α 抑制剂等免疫调制剂的患者、活动性 AIDS 患者、营养不良或其他潜在免疫细胞数量及功能缺陷的患者，以及接受血液透析的患者。ICU 的危重患者和慢性呼吸道疾病如囊性纤维化的患者也有患侵袭性曲霉病的风险[17,27-30,41]。

对曲霉病的诊断，临床样本中曲霉培养阳性(或基于抗原或核酸检测技术)或许不能代表病理过程。在高度免疫抑制的患者和慢性呼吸道疾病患者中，区分曲霉的呼吸道定植或是侵袭性感染是相当困难的[42-43]，但随着免疫抑制程度的增加，接受抗曲霉治疗的概率也随之增加。为了使辅助诊断和对血液系统恶性肿瘤患者的临床试验更加标准化，欧洲癌症研究和治疗组织/侵袭性真菌感染协作组(EORTC/MSG)发布了曲霉病的确诊和拟诊的共识，内容包括宿主的免疫状态、肺部影像(计算机断层扫描)结果、基于抗原的生物标志物检测、组织学和培养结果，但不包括核酸检测[44]。也制定了对患有慢性阻塞性肺疾病及单纯性慢性肺曲霉病患者合并侵袭性曲霉病的诊断标准[45-47]。在临床表现相符的情况下，从组织或其他标本中发现菌丝，且从同一标本中培养出大量的曲霉(或从多个标本中检查出相同的菌种)预示侵袭性曲霉病。当怀疑有肺部真菌感染时，建议至少采集 3 个高质量的痰标本送检。抗原和核酸的诊断在下文中进行讨论。

表 122-3　曲霉感染的临床分类和主要病原菌[a]

临床表现	疾病	与疾病相关的菌种
过敏(超敏反应)	变应性支气管肺曲霉病(ABPA);SAFS[b]	烟曲霉(土曲霉);曲霉属某种;哮喘
腐生性	曲霉球(Aspergilloma)	烟曲霉;已有的空洞,肺结核
	耳真菌病(Otomycosis)	主要为黑曲霉引起
	甲真菌病(Onychomycosis)	主要为杂色曲霉复合群和聚多曲霉引起
半侵袭性 Semi-invasive[c](菌丝入侵组织)	慢性坏死性肺曲霉病	烟曲霉;结构性肺疾病
	角膜炎	烟曲霉,黄曲霉和其他菌种
侵袭性[d]	鼻窦炎(鼻-眶-颅底疾病)	烟曲霉,黄曲霉
	(急性侵袭性、慢性侵袭性、慢性肉芽肿;曲霉球)	发展中国家以黄曲霉为主。肉芽肿性鼻窦炎(苏丹,印度、巴基斯坦、沙特阿拉伯)黄曲霉(90%),烟曲霉,黑曲霉
		烟曲霉,黄曲霉,构巢曲霉,土曲霉
	侵袭性支气管曲霉病(浅表的,假膜性的或溃疡性的气管支气管炎)	肺移植、AIDS
	侵袭性肺曲霉病	烟曲霉,土曲霉,黄曲霉
	菌丝侵入(化脓性肉芽肿性炎症/坏死)	免疫抑制,非粒缺;GVHD,SOT,CGD,HIV/AIDS,使用糖皮质激素
	侵袭血管(凝固性坏死,出血性梗死)	长期、严重的中性粒细胞缺乏

注:[a] 见文献[37]. CGD. 慢性肉芽肿性疾病;IPA. 侵袭性肺曲霉病;GVHD. 移植物抗宿主疾病;SAFS. 真菌致敏性重症哮喘;SOT. 实体器官移植;[b]SAFS 可由非曲霉属的真菌引起;不符合 ABPA 的血清学标准[37];[c] 由 Chakrabarti 等[28]与 Thompson 和 Patterson[16]定义;[d] 由 Hope 和 Denning 基于组织被菌丝侵袭程度(伴随或不伴随血管侵袭)进行的分类[37]

(五)标本的采集、运输和存储

由于区分分离自患者的曲霉是定植(甚至是污染菌)还是感染的不确定性,采用恰当的临床标本采集方法(第 117 章)对侵袭性肺曲霉病的诊断尤为重要。对曲霉病的诊断是比较困难的[38,47],尤其在非中性粒细胞减少的患者和气道受损的患者(例如接受肺移植的患者)中。在诊断曲霉病中最直接的证据就是从肺活检组织中及其他正常无菌部位培养出曲霉,和(或)在组织病理检查中发现菌丝。然而,对于较容易获取的非无菌标本,如痰及支气管肺泡灌洗液(bronchoalveolar lavage fluid,BALF)中培养出的曲霉则可能为定植[48]。培养结果需结合临床表现、影像学和其他诊断结果综合判断评估。

曲霉也可分离于呼吸道以外的其他部位,比如鼻窦、脑脊液(cerebrospinal fluid,CSF)、皮肤、其他组织、眼和心脏瓣膜。与其他侵袭性感染一样,在曲霉心内膜炎中,血培养通常呈阴性。相反,即使在侵袭性曲霉病高风险人群中血培养曲霉菌阳性也通常提示污染[49],尽管存在个别的血培养帮助诊断播散性感染和真菌血症的病例报道,如土曲霉真菌血症[50]。所有用于培养和其他检测的标本都应尽快运送到实验室。若采用存档标本进行曲霉 DNA 的检测,如石蜡包埋(paraffin-embedded,PE)的组织,需将组织切成薄片(大约 $10\mu m \times 10\ \mu m$)置于无菌容器中[51],建议弃去可能被真菌孢子污染的第一片。

(六)直接检测

1. 显微镜检查　新鲜和(或)染色的组织标本、支气管肺泡灌洗液、痰、组织抽吸物和其他样本的显微镜检查可能检测出真菌,但此方法不灵敏,且只有在疾病的进展期才能检测出阳性。使用氢氧化钾制片或荧光染色(如钙荧光白或 Blankophor P)常可观察到菌丝,使用特殊的真菌染色方法对活检组织标本染色也可进行菌丝的观察,如六胺银染色(Gomori methemamine silver,GMS)、Grocott 染色和过碘酸雪夫(periodic acid-Schiff,PAS)染色。在使用苏木素和伊红染液(HE)对组织标本进行染色查找菌丝时,需注意不要破坏组织,因为活体菌丝通常是嗜碱性到双染性的,而被损坏或坏死的菌丝常为嗜酸性的[52]。

虽然显微镜检测不能将曲霉鉴定到种,却能对真菌感染进行初步诊断;EORTC/MSG 分级中对曲霉感染进行"证实"或"明确"则需对组织中真菌的形态和菌丝的特点进行评估[44]。曲霉菌丝通

常为透明、分隔、直径 6 μm、锐角分枝(约为 45°),但并不是以上所有特征全部存在(图 122-3a 肺组织的 HE 染色)。菌丝有光滑平行的细胞壁,在分隔的位置存在(或不存在)轻微的收缩[14,52]。发生侵袭性感染时,菌丝可以平行或放射状地扩散到整个组织。在慢性肺空洞中,曲霉菌丝聚集成团,还可能表现出非典型的菌丝特点如直径肿胀到 12 μm 或明显的间隔缺失。患者在接受抗真菌治疗后(尤其是棘白菌素类药物),也能见到菌丝末端膨大这种不常见的形态。

在组织中还可以观察到曲霉其他结构形态[分生孢子、子囊果和其他无性结构(图 122-2)],可用于曲霉的推测性鉴定。例如,在组织中土曲霉沿横向的菌丝壁产生特征性的厚垣孢子[53];草酸钙结晶可能与黑曲霉感染有关[54]。但培养、免疫组化染色或核酸扩增对病原体的鉴定仍然是必需的。用显微镜检查方法来区分曲霉属和非曲霉属的透明霉菌,其特异性很低[55]。用特异荧光抗体标记的原位杂交技术可用于检测组织中的真菌,辅助真菌感染的诊断,尽管该免疫组化方法的应用尚未被确认,但在一项研究中显示,该方法对组织标本中的镰刀菌和曲霉成分进行区分的阳性预测值(positive predictive value,PPV)为 100%[56]。

2. 抗原检测 半乳甘露聚糖(galactomannan,GM)是曲霉细胞壁上主要的多糖组分,也存在于大部分青霉属(篮状菌属)菌种和其他丝状菌中,其可在菌丝生长的过程中被释放出来。商品化的 GM 试验已被很好地验证。Platelia *Aspergillus* 酶联免疫吸附试验(enzyme-linked immunosorbent assay,ELISA)(BioRad Laboratories,Hercules,CA)是一种双抗体夹心 EIA 方法,其使用一种小鼠单克隆抗体(mAb)EBA-2 直接检测 GM 抗原侧链的呋喃半乳糖苷[57]。这个试验的数据使 GM 试验也被纳入了 EORTC/MSG 制定的免疫抑制患者及血液学和实体器官移植患者中侵袭性曲霉病诊断规定的修订版中[44,57-63],这些规定可用于临床和流行病学研究;但在临床实践中,其需要与临床-病理描述和分类相结合(见"临床意义")。虽然 EORTC/MSG 推荐的 GM 试验检测标本包括血浆、血清、支气管肺泡灌洗液或脑脊液,但临床上只对血清样本进行了广泛的验证,后来 Bio-Rad 还发布了对支气管肺泡灌洗液样本进行 GM 试验的评估结果(回顾性分析、meta 分析及系统性分析见参考文献[58-62])。

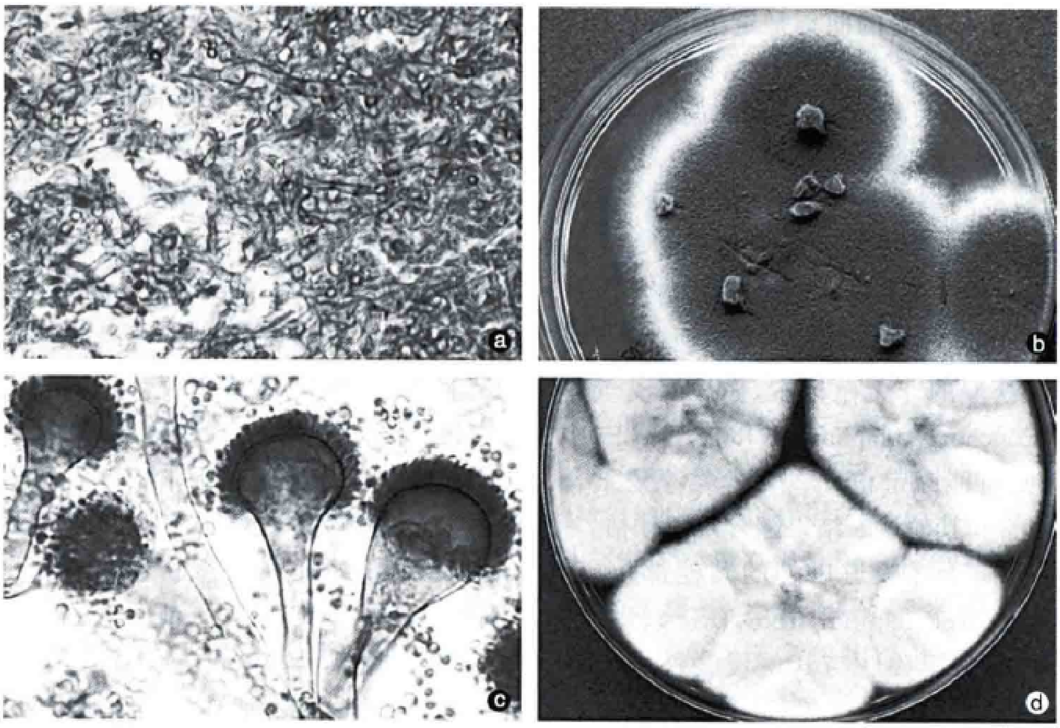


图 122-3 a. 肺组织 HE 染色,可见光滑、透明、有分隔、呈锐角分枝的曲霉菌丝。b. 马铃薯葡萄糖琼脂上的烟曲霉,典型的蓝绿色绒毛状菌落,表面含有密集的分生孢子。c. 烟曲霉柱状的分生孢子梗(可达 400 μm×50 μm 长),可能更短、单列生长。顶囊倒立烧瓶状,上 2/3 生长有单层排列的瓶梗。分生孢子球形到近球形,向基性生长形成长链。d. 迟缓曲霉菌落形态,白色绒毛状到絮状,点缀着分生孢子形成的灰绿色斑点(产孢缓慢到缺乏)

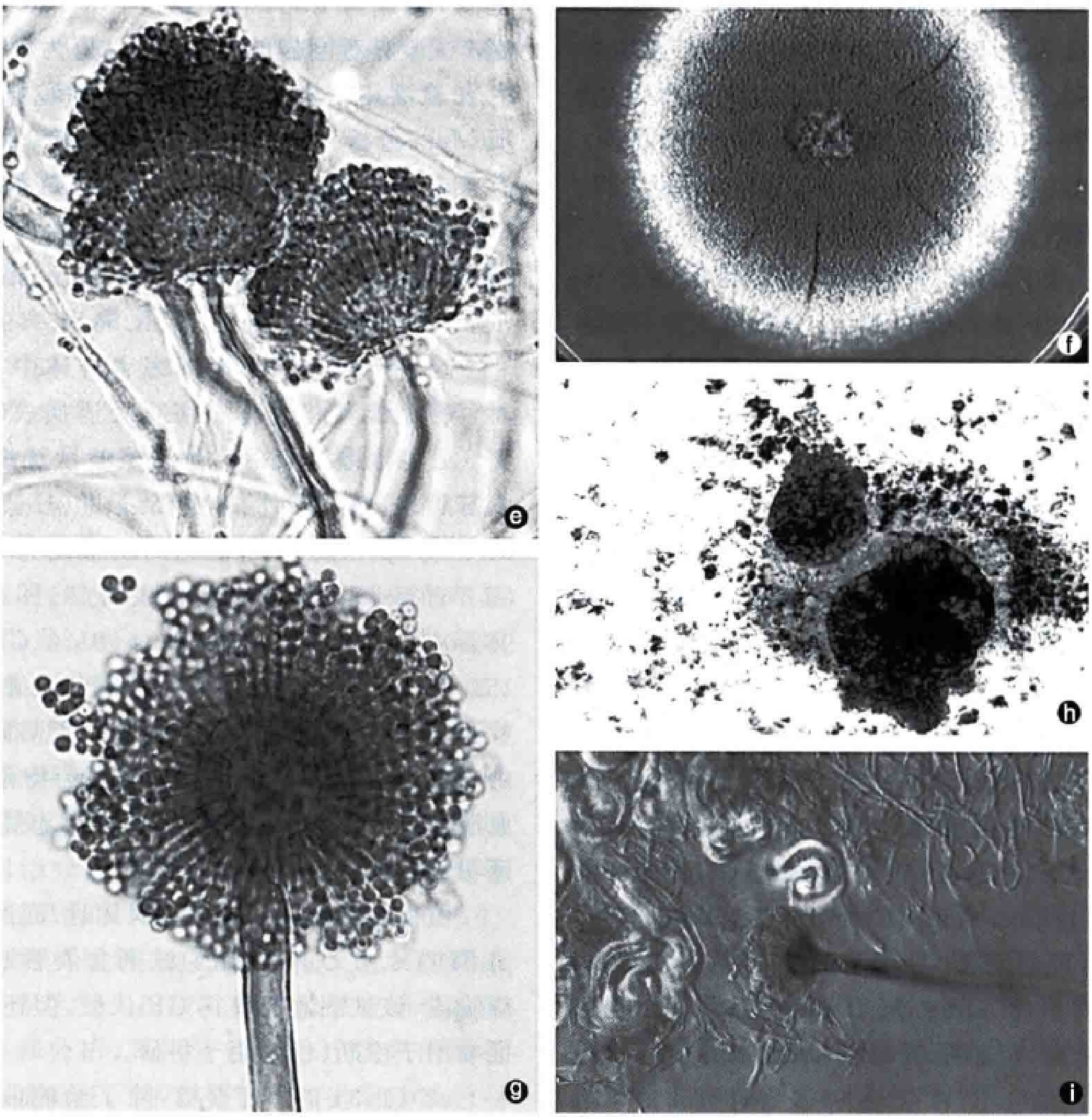


图 122-3(续) e. 迟缓曲霉的分生孢子梗短、柱状、单列生长,菌柄宽度较烟曲霉窄。顶囊近球形(直径 6～25 μm),较烟曲霉(10～26 μm)小。f. 黄曲霉菌落呈颗粒状、扁平状、常有放射状沟回,开始呈黄色,随着快速的生长变为明亮到灰暗的黄绿色。g. 黄曲霉双层瓶梗的曲霉头。h. 构巢曲霉(构巢裸孢壳)的闭囊壳。i. 焦曲霉双层瓶梗的曲霉头、棕色的菌柄和壳细胞,见彩插

基于一项 meta 分析,使用光密度指数(optical density index,ODI)为 0.5 作为诊断侵袭性曲霉病的临界值,血清 GM 试验的敏感性和特异性分别为 71％和 89％,阳性预测值较低,为 26％～53％,但阴性预测值(negative predictive value,NPV)较高,为 95％～98％[58],因此,建议 GM 试验更多的作为排除曲霉病的筛选指标,而不是诊断指标。血清 GM 的敏感性和特异性在不同的研究中有很大的差异,主要是由于研究设计和研究对象不同,在中性粒细胞缺乏患者和接受造血干细胞移植患者中,其敏感性比接受实体器官移植或慢性阻塞性肺疾病的危重患者更高[64-67]。作为血液系统恶性肿瘤患者侵袭性曲霉病的诊断试验,连续两个样本的 ODI 阳性,即 ODI 至少达到 0.5,特异性和 PPV 可增加到 98.6％[68]。使用这个 ODI 值的目的是通过"筛选"排除不太可能患有疾病的患者,将侵袭性曲霉病的风险降到最低。Maertens 等[68]进一步推荐单次 GM 结果阳性(≥0.7)有诊断价值。抗真菌药的使用可降低患者血清 GM 试验的敏感性[69];使用哌拉西林-他唑巴坦(尽管这种抗菌药物的新配方似乎降低了假阳性结果的发生率)的患者,肠道中存在双歧杆菌的新生儿使用阿莫西林-克拉维酸,以及摄入含有 GM 的食物时,GM 试验可出现假阳性[66]。另外,一些非曲霉属的丝状真菌也可能会引起 GM 试验出现阳性结果(马尔尼菲篮状菌、荚膜组织胞浆菌、尖

孢镰刀菌、拟青霉属和链格孢菌)[61]。一个包含了19项研究的系统性回顾得出的结论是：在儿童中检测血清GM，当作为筛查工具及诊断试验时，敏感性、特异性和阳性预测值均是高度可变的，在作为筛查时阴性预测值为85%～100%，作为诊断时阴性预测值为70%～100%[70]。

最近有3篇对使用支气管肺泡灌洗液进行GM试验的系统性回顾和Meta分析的文章，试验对象为血液系统恶性肿瘤患者或其合并症患者[60-62]，尽管对支气管肺泡灌洗液GM试验阳性标本的ODIs临界值有不同的推荐，如Zou等[60]建议为1.0，而Heng等[61]为1.5，Guo等[62]未得出一致意见。这些研究都阐述了GM试验公认的局限性，但得出了支气管肺泡灌洗液的GM试验比血清更灵敏的结论。有研究认为，抗真菌药对BALF-GM试验有影响的数据存在相互矛盾的现象，因此需要标准化的方案来解决这些差异[61]。尽管如此，在诊断评估时，对支气管肺泡灌洗液GM推荐的阳性阈值至少为1.0(http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceCompliance-RegulatoryInformation/Guidances/UCM420248.pdf)。也有证据表明，在患有慢性阻塞性肺疾病的危重患者中，BALF-GM试验比血清的敏感性和特异性更高，但其所提出的ODI临界值为0.8仍需验证[71]。

(1)应用侧向层析(lateral flow)技术检测曲霉抗原：一个比GM试验更特异的简单试验已用于对曲霉感染的快速诊断，其不需要特殊的设备，但目前需要对血清样本(不用于支气管肺泡灌洗液)进行前处理的步骤(加热、离心及添加缓冲液)，这降低了床旁检测(point-of care test，POCT)的应用。这种曲霉菌侧向层析试验，即AspLFD试验(OLM Diagnostics，Newcastle-upon-Tyne，United Kingdom)的原理是使用小鼠单克隆抗体MAb(JF5)与曲霉细胞外糖蛋白结合，该糖蛋白位于成长中的芽管细胞壁上，在发育的菌丝尖端分泌，但在未出芽的分生孢子上不存在[72-73]。有些真菌抗原如马尔尼菲篮状菌、荚膜组织胞浆菌、尖孢镰刀菌和链格孢菌会和GM试剂盒中的MAb EB-A2发生交叉反应，但这些抗原不会与MAb JF5发生交叉反应。MAb JF5可与拟青霉属和非篮状菌的青霉菌之间发生交叉反应[72]。对来自血液系统恶性肿瘤患者的样本进行检测，结果显示AspLFD(OLM Diagnostics)与GM试验具有同样的特异性，且更为敏感[74-76]，与PCR检测相结合可提高敏感性和特异性[76]。一项Meta分析报道，在对确诊或临床诊断为曲霉病者与未患曲霉病者进行区分，汇总的敏感性为68%(95% *CI* 52%～81%)，特异性为87%(95% *CI* 80%～92%)，诊断比值比(diagnostic odds ratio，DOR)为11.9(95% *CI* 3.54～39.96)[74]。

在许多研究和不同的患者群体中，包括实体器官移植受者和患有潜在呼吸道疾病者中，使用支气管肺泡灌洗液标本检测该项目对诊断侵袭性曲霉病也进行了评估，该结果也汇总于上述的Meta分析[74]报道中，汇总的敏感性为85%(95% *CI* 76%～93%)，特异性为93%(95% *CI* 89%～96%)，诊断比值比为15.94(95% *CI* 27.21～159.81)。总体来讲，对血液系统恶性肿瘤患者的检测敏感性(67%)低于其他患者组，很有可能是由于在这些患者中使用了抗真菌药物预防。对于血清学试验，结合其他真菌生物标志物检测已被证明可以大大提高敏感性[76-77]。

值得注意的是，在撰写本文时，商品化的AspLFD(OLM Diagnostics)试剂盒依然处于申报等待阶段，该试剂盒已获得CE认证，但还未获FDA批准用于诊断，仅能用于科研。

(2)(1,3)-β-D-葡聚糖：除了检测曲霉GM和目前较新的曲霉抗原[68]以外，通过对血清中(1,3)-β-D-葡聚糖进行比色测定是诊断侵袭性曲霉病的另一种方法。与曲霉GM试验一样，(1,3)-β-D-葡聚糖的检测也已被EORTC/MSG纳入侵袭性曲霉病评估的诊断标准中[44]。(1,3)-β-D-葡聚糖是真菌细胞壁的主要成分，可对侵袭性曲霉病患者血清中该抗原进行定量检测[78-81]，检测下限接近于1 pg/ml，当抗原浓度≥80 ng/ml(Fungitell Assay; Associates of Cape Cod，Inc.，Falmouth，MA)即认为可预测真菌感染。其他的检测试剂盒(包括Fungitec-G; Seikagaku Corporation，Tokyo，Japan)已在亚洲商品化，但只有Fungitell试剂盒被FDA批准用于诊断。(1,3)-β-D-葡聚糖检测仅批准了血清标本的应用。

然而，该试验不能区分由曲霉引起的感染抑或是其他真菌引起的感染，也导致其较低的阳性预测值(最好结果约为50%)，这也是对曲霉病诊断的关键限制因素。有研究显示其对许多系统性真菌感

染的敏感性、特异性和阴性预测值分别约为 93%、77%和 98%[79]。在 4 项包含血液病患者和其他患者群体中各种真菌感染的 meta 分析中，汇总的敏感性为 60%～80%，特异性为 80%～90%[78-82]，其中一项分析的阳性似然比为 5.2，阴性似然比为 0.29[82]。最近一项针对于血液肿瘤患者的包含 6 个队列研究的 meta 分析报道，当进行连续 2 次检测时，敏感性和特异性分别为 49.6%（95% *CI* 34.0%～65.3%）和 98.9%（95% *CI* 97.4%～99.5%），对发病率为 10%的任何侵袭性真菌病，估算的阳性预测值和阴性预测值分别为 83.5%和 94.6%[78]。不同的(1,3)-β-D-葡聚糖检测试剂对真菌感染的诊断被观察到有相似的准确性。

数据表明，对于侵袭性曲霉病，该检测的敏感性范围较宽，为 60%～100%。尽管存在这些局限性，但如果与其他特异性试验联合使用，血清(1,3)-β-D-葡聚糖试验对曲霉病的诊断会有更好的阴性预测值；使用抗真菌药物可降低该试验的敏感性[80-82]。相反，在血液透析（使用纤维素膜）、使用免疫球蛋白治疗或使用过含葡聚糖材料的患者中，通常会出现假阳性结果[57,82]，血清(1,3)-β-D-葡聚糖会与阿莫西林/克拉维酸和革兰阳性菌的细胞壁成分发生交叉反应。检测结果应结合临床情况进行解释分析，其用于监测治疗效果的价值还需要进一步验证。对于支气管肺泡灌洗液进行(1,3)-β-D-葡聚糖的检测还没有广泛的研究，但似乎对曲霉病的特异性很低[77]。

3. 核酸检测 对临床标本中曲霉 DNA 的检测，可使用专门针对曲霉的核酸扩增方法，也可使用泛真菌(panfungal)PCR 技术扩增后进行 DNA 测序来鉴定菌种。前者具有更高的敏感性和更短的周转时间（不需要 DNA 测序），但后者有更广泛的诊断潜力。这 2 种方法都可以直接从组织、血液、脑脊液和呼吸道标本中鉴定曲霉属菌种[51,83-85]。虽然对这 2 种方法的性能评价在不同研究间变异较大（敏感性为 40%～100%，特异性 60%～100%，见文献[57]和[86]），但它们仍具有良好的总体敏感性和特异性。随着扩增产物检测技术的发展，可通过 TaqMan，LightCycler，高分辨率熔解曲线分析，或基于核酸序列扩增的方法对曲霉 DNA 进行实时检测和定量检测；这些方法在其他部分有详述[57,87-88]。多种针对于不同基因序列(18S rDNA，ITS 区和线粒体 DNA)的自建方法已被用于临床标本中曲霉属的检测，但由于缺乏 PCR 方法的标准化（包括 DNA 提取的步骤），检测结果差异很大。到目前为止，这些因素阻碍了将 PCR 方法纳入当前 EORTC/MSG 对侵袭性曲霉病诊断的微生物学标准中。

在 ISHAM 的欧洲曲霉 PCR 工作组(EAPCRI)正式阐述曲霉 PCR 试验有一定的临床应用限制（见下文）之前，Mengoli 等[89]系统性地回顾评估了此试验的诊断价值[特别是诊断优势比(DORs)]及在侵袭性曲霉病筛查中的作用。16 项研究中使用 PCR 方法对包括全血、血清或血浆样品进行检测（来自 1618 例侵袭性曲霉病高风险患者>10 000 例的样本），对这些研究进行 meta 分析表明，如果在高危期的初始阶段将 PCR 检测作为一种筛选工具，那么一个阴性的 PCR 结果足以排除曲霉病，2 个阳性的 PCR 结果则能最大限度提高特异性，合并计算的敏感性为 75%（95% *CI* 54%～88%），特异性为 87%（95% *CI* 78%～93%），PPV 为 15.2%～81%，NPV>97%。这些研究在许多方面存在差异，如对高危人群的研究方法、PCR 方法、样本种类（如全血与血清）及样品的体积[89]，事实上，1 ml 的血清比 100 μl 的血清敏感性更高(100% *vs*. 76.5%)[90]。

PCR 技术检测 BALF 样本用于辅助诊断侵袭性肺曲霉病有很好的潜力[61,91-92]。最近对肺移植患者使用泛曲霉 pan-*Aspergillus* 进行实时定量荧光 PCR 的评估显示，敏感性和特异性分别为 100%和 88%，与烟曲霉特异性 PCR 的结果相似[91]。尽管在不同分析方法中反映诊断确定性的 PPVs 存在差异，但研究结果均具有较高的 NPV 和良好的敏感性。

EAPCRI 及国际合作[93-94]已经允许 PCR 分析的多中心临床验证，这也是对每个 PCR 步骤（尤其是 DNA 提取）进行标准化的起源。值得注意的是，下列因素会影响曲霉 PCR 的分析质量和结果，包括：样本类型，样本的体积，真菌 DNA 的提取方法和 PCR 过程自动化的潜力（可提高敏感性）。使用 PCR 方法对曲霉病进行诊断时，选择全血或血清作为样本检测敏感性并没有显著差异，尽管一些研究中发现，全血检测具有更敏感的趋势(85%～91% *vs*. 79%)，特异性为 96%，且比血清标本更早获得阳性结果（36 天 *vs*. 15 天）[95-96]。与此相反的是，使用血清可以减少假阳

性率，处理过程更简单。最佳的样品类型应按当地要求来确定。随后的一篇 meta 分析阐述了遵从 EAPCRI 推荐的研究具有更高的诊断准确性[97]，这些研究中的大多数病例来自血液病患者，对于其他类型免疫抑制患者血清的 PCR 检测结果尚不确定。

已经有几种商品化的多重实时 PCR 试剂盒可以应用，如 AsperGenius（PathoNostics，Maastricht，the Netherlands），RenDx Fungiplex（Renshaw Diagnostics，Ltd.，Glasgow，United Kingdom），PLEX-ID Broad Fungal Assay（Abbott，Abbott Park，IL）和 MycoGENIE（Ademtech-Bioparc BioGalien，Pessac，France）[98-100]。尽管 MycoGENIE 检测已被 CE 批准用于体外诊断，但一些试剂盒并没有被 FDA 批准[100]。此外，MycAssay *Aspergillus* assay（Myconostica，Manchester，UK）是一个可使用质量控制试剂进行标准化检测的平台。在高危血液病患者中，该试剂盒对血清和 BALF 标本检测的敏感性为 65%，特异性为 95%[101]。对非血液病的侵袭性肺曲霉病患者下呼吸道样本进行检测，其敏感性、特异性、PPV 和 NPV 分别为 86.7%、87.6%、34.1%和 92.2%；对多个样本进行检测可增加敏感性[102]。此方法检测曲霉的中位数时间为 4 h。AsperGenius（PathoNostics）试剂盒通过 28S rRNA 基因靶位，特异性检测烟曲霉复合群、土曲霉和曲霉属其他菌种，也能检测烟曲霉中最普遍的 *CYP*51 基因突变，即 TR34，L98H，Y121F 和 T289A 突变，该突变可引起耐药[99]（见下文“抗真菌药物体外药敏试验”）。

抗原检测与核酸扩增试验在临床的联合应用：上文中对于 GM/（1，3）-β-D-葡聚糖抗原和曲霉 PCR 试验诊断侵袭性曲霉病的一些局限性已进行了阐述，测试结果可以有很大的差异，而且（1，3）-β-D-葡聚糖试验对于曲霉属检测并不特异。虽然对曲霉 PCR 检测的很多步骤制定了标准化的程序，但在其广泛应用前还需做大量的工作。

尽管如此，从大量已发表的文章中可见，这些检测的联合应用有助于对包括儿童血液病患者[70]在内的侵袭性曲霉病早期的诊断。最近一项对血液病高危患者中曲霉检测的随机试验中，GM 与 PCR 试验联合应用，与培养和组织学方法联合应用相比较，结果显示 GM 与 PCR 联用的方法减少了经验性抗真菌药物的治疗时间，使疑为曲霉病的诊断中位数时间提前了 4 天，此检测在接受氟康唑、伊曲康唑治疗或未接受预防性抗真菌治疗的患者中是非常有效的[103]。Rogers 等[104]的研究表明，将 PCR 方法与 GM 试验联合应用来监测血液系统恶性肿瘤患者中侵袭性曲霉病的发生，会提高诊断的准确性。还有报道显示，在高达 88.8%的患者中，使用 GM 和 PCR 方法联合应用来诊断侵袭性曲霉病，比使用培养和高分辨率 CT 扫描的方法进行诊断的中位数时间提前了 2～9 天[95,105]，在血液病患者中侵袭性曲霉病的诊断，使用血清 GM 和 PCR 试验可获得更高的敏感性[105-106]，一项 Meta 分析表明 GM 和 PCR 联合应用可高度预测活动性感染（PPV，88%）。使用曲霉菌侧向层析试验（OLM Diagnostics）与曲霉菌 PCR 方法联合对曲霉病患者进行诊断/拟诊时敏感性和特异性均为 100%[76]。

（七）分离程序

曲霉生长要求不高，通常很容易在标准的真菌培养基上生长，也可以在细菌培养基如血琼脂平板上生长。有时会使用选择性培养基对呼吸道标本进行培养来检测非曲霉属的丝状真菌（如使用孟加拉红琼脂培养基筛选赛多孢菌）[107]，此时需注意的是，这些培养基会抑制曲霉的生长，需要考虑标本中存在与临床相关的曲霉的可能性。

大多数鉴定程序需使用特定的培养基并在特定的培养条件下对曲霉特征进行描述，如菌落颜色和大小（直径）（图 122-3）。曲霉属菌种通常很容易在 25 ℃或更高温度下生长。虽然分离过程不需要特殊的生物安全防护措施，但在Ⅱ级生物安全柜内处理所有的培养样本是实验室操作的良好习惯，可避免孢子扩散到环境中和引起交叉污染。培养过程通常需要几天的时间。

（八）鉴定

尽管分子和蛋白组学的检测手段在增多，但基于培养方法对曲霉进行鉴定仍然很重要，常见病原菌的种/种复合群鉴别特征总结见表 122-2。对曲霉的分类学要点和其他信息，也可参见 de Hoog 等[14]编著的手册。图 122-2 列出了几种曲霉主要特点的图例。有些菌种能产生有性结构（即闭囊壳和子囊孢子），可辅助鉴定，常见曲霉各自有性型的命名也包含在括号内［如裸孢壳属，新

萨托亚属(表 122-2)]。

曲霉的表型鉴定需要对菌落形态和镜下特征进行观察评判。接种的培养基和培养条件可影响曲霉菌的形态特征。推荐使用含或不含 20%葡萄糖的察氏酵母溶解琼脂和(或)2%的麦芽浸汁琼脂(Oxoid)用于鉴定和形态特征观察[1]。分离株通常点种于培养基的 3 个点上,在 25 ℃条件下孵育[1,14]。多数菌种在 7 天内可产孢,但有性形式需更长的时间。对其描述主要基于菌落的颜色和分生孢子头的形态,这些内容参考了一些专家的专著[4,8]。

1. 菌落特征 培养 7 天后,观察并记录重要的菌落特征,包括生长速度、质地、产孢程度、正面和背面的颜色、液滴的分泌、色素的扩散、菌核、壳细胞、闭囊壳和子囊孢子的产生等(图 122-3b～i)[1,14,108]。对不能鉴别的菌株应保留更长的时间,因其可能生长出子囊果或其他可以辅助鉴定的结构。

2. 镜下形态特征 在麦芽浸汁琼脂上培养 7～10 天后,最好在孢子产生的位置,使用透明胶带的旗帜法或玻片小培养法覆盖于乳酸上来准备显微镜检查的制片[1,108]。乳酸酚不再被推荐用于制片,因为其具有腐蚀性,苯酚具有毒性。但乳品红仍被广泛使用[1]。曲霉的分生孢子是疏水性的,通常使用一滴 70%乙醇去除气泡和多余的孢子。主要特征是透明菌丝,具有独特的分生孢子头,由一个顶囊上盘旋排列着许多瓶梗构成,形态烧瓶状(图 122-2)。具体来讲,重要的鉴定要点在于包括菌柄在内的各种结构大小、形态、颜色和细胞壁纹饰方面存在的差异,主要包括菌柄、顶囊的形态和大小以及瓶梗排列。菌柄或分生孢子梗可直接来源于营养菌丝或来自于一种叫足细胞的特殊菌丝细胞。分生孢子梗通常不分隔,各个种之间在颜色、长度和细胞壁纹饰上有差异。菌柄末端是一个膨大的形状多样的顶囊(球形、近球形、半球形、梨形或棒状)(图 122-2)。整个顶囊或顶囊的上半部分覆盖有瓶梗,瓶梗可产生分生孢子。曲霉分生孢子头的形态为顶囊上生长出单层或双层排列的瓶梗,双层瓶梗的底层称为梗基,有的曲霉在同一分生孢子头上可同时出现单层和双层的瓶梗,如黄曲霉(图 122-2,表 122-2)。

分生孢子可能来自于单一的柱状瓶梗细胞,或来源于与菌柄呈直角生长(发散生长)又分离的多个柱状瓶梗细胞,这些特征需在显微镜下才能观察到,分生孢子通常为椭圆形或球形,可有小棘,其大小、颜色和细胞壁形态在不同的菌种中有区别,推荐使用微分干涉相差显微镜进行分生孢子梗形态的观察[1,108]。

菌核为坚硬、子囊果样结构,包含膨大的菌丝细胞,但无内生孢子。壳细胞为各种球形,壁厚且折光性强(图 122-3i),这些结构通常在靠近菌落中间的菌丝体内被发现,存在的位置通常有液滴状的分泌物,这往往与闭囊壳有关(表 122-2)。闭囊壳内部充满子囊和子囊孢子,这些结构的形状、颜色、大小和细胞壁特征是区分不同有性形态的重要特征。

3. 产孢缺陷的种或变种 虽然在 25 ℃光照的条件下,使培养物处于白天和黑夜的昼夜循环周期可能有助于诱导孢子的产生[109-110],但对产孢缺陷的菌株鉴定依然会比较困难。分离自临床标本的产孢缺陷菌株并不少见[109],包括在患曲霉病和囊性纤维化的患者。如分离到,且呈现不典型形态,以及在 45 ℃时可为蜡状或脑回状菌落时,应考虑烟曲霉复合群[烟色组所有的菌株可以在 45 ℃生长(表 122-2)]。现已公认,烟曲霉的各种隐形种如迟缓曲霉、*A. thermomutatus* 和其他与其具有亲缘性的种为产孢缺陷的表型[7,109]。迟缓曲霉的顶囊较小(表 122-2,图 122-3e),不同于烟曲霉的是其不能在 48 ℃或 50 ℃生长,但在实际中,如没有扫描电子显微镜或其他精密的显微镜,只使用形态学方法是不能将其与烟曲霉相区别的。因迟缓曲霉对唑类、两性霉素 B 和卡泊芬净的体外敏感性较低[7],所以对于临床有意义的所有分离菌株准确的鉴定非常重要。自从迟缓曲霉作为一个新种被发现后,对烟曲霉分离株的筛选鉴定就不再包含被误认为是烟曲霉的病原菌,如绿垂曲霉、猫曲霉和宇田川曲霉[30,109](在参考文献[111]中有总结),这些菌株对抗真菌药物的体外敏感性也显示出较大的差异,且导致很高的病死率(见下文"药物敏感性试验")[111-112]。对于迟缓曲霉,仅使用表型鉴定的方法不能将其与烟曲霉区分开。

4. 分子生物学鉴定 传统的表型方法不能鉴定曲霉分离株或不能对其准确鉴定(如对不产孢菌株)。因此,DNA 序列分析在这方面能有所帮助。因为不能依靠单一的基因进行鉴定,所以比

较多位点序列分析是分子鉴定的金标准[1]。ITS区,包括5.8S rRNA基因区域,对曲霉的鉴定通常比28S亚基的D1-D2区有更好的辨识度[110,113-114]。ITS1-5.8S-ITS2区域是真菌通用的DNA标记码[115]。然而,ITS区没有包含足够的变异来区分一些曲霉分支中的菌种,因此,其他一些基因靶位包括β-微管蛋白基因、rodlet A蛋白基因和线粒体细胞色素b基因在鉴定中也是必要的[1,109,111,112,116]。ISHAM曲霉工作组推荐使用比较测序鉴定法,即使用ITS区测序将曲霉鉴定至种复合群水平,再使用一个蛋白的编码位点(β-微管蛋白基因)将其从复合群中鉴定出来[1]。这种方法成功地用于了对美国移植相关感染监测网(TRANSNET,USA)收集的218株曲霉的鉴定[30],以及西班牙FILPOP研究中的278株曲霉(86.3%)[33]。尽管*ben A*引物的位点可能太多变而不能用于系统发育重建[14],但其对黑色组中的一些菌种可先扩增*tubC*同种异性基因[117]。钙调蛋白基因,*CaM*,最近被认为是比较适合辅助曲霉鉴定的标志物,因其与ITS序列联合,很容易对曲霉所有菌种进行扩增和区分[1]。为了改进基于ITS序列对菌种的鉴定,可以根据RefSeq数据库(https://www.ncbi.nlm.nih.gov/refseq/)搜索序列,该数据库仅包含经过验证的ITS序列[118]。

非测序鉴定方法包括实时荧光定量PCR和利用Luminex xMAP技术(Luminex Corp.,Austin,TX)的基于曲霉特异性微球法。此外,通过对*ben A*基因的PCR限制性片段长度多态性(restriction fragment length polymorphism,RFLP)分析,可准确对烟色组的3个主要曲霉(烟曲霉、迟缓曲霉和宇田川曲霉)进行区分[119]。Alonso等[87]开发了一种实时荧光定量PCR的方法,使用探针杂交和高分辨率熔解曲线结合的方法对烟色组和非烟色组的曲霉进行鉴定,最低检出限为10^2个孢子/ml。基于微球技术的Luminex(Luminex Corp.)检测可将曲霉鉴定到种复合群水平,也可对烟曲霉复合群内的菌种进行鉴定[120]。

准确的曲霉报告取决于:①临床对准确鉴定到种的需求(如从组织活检标本抑或从痰标本中分离);②分子检测方法的应用。在较小的实验室,"种复合群"术语的使用有助于正确的鉴定,因使用形态学方法可将菌株相对可靠的鉴定到组的水平。例如,一个实验室可以通过表型方法确定某个真菌为烟曲霉复合群,这预示需要使用分子生物学鉴定方法将其从复合群鉴定到种的水平。

5. 质谱鉴定方法 在临床实验室,使用基质辅助激光解析电离飞行时间质谱(MALDI-TOF MS)对丝状真菌培养物鉴定的评估越来越多,这可以减少曲霉鉴定的周转时间。尽管最初出现了相对复杂的谱图及遇到了曲霉细胞壁方面的技术困难,但此技术在分离株鉴定方面不仅可以鉴定到种复合群水平,也可鉴定到种的水平,在一些报道中还可以鉴定出变异株[121-127]。目前有几种描述得很好的丝状真菌分析前标准的样品制备方法[122-123]。对于曲霉菌种,建议在目标裂解前使用玻璃珠对细胞和孢子进行机械破坏,以确保获得高区分度的谱图[124-125]。此外,还需要一个强大和广泛的参考谱图数据库,以便准确鉴定菌种[126,128]。许多商业数据库只有几个菌种和种内菌株的描述,需要通过合并经有效验证的自建谱图进行补充,这些谱图来自于代表每个足够数量准确鉴定的菌种和菌株[121-122,126-128]。

Bille等[128]使用Andromas系统(Andromas SA,Paris,France)对曲霉属的总体鉴定正确率为98.4%(63/64株),Alano等[129]报道的鉴定率为98.6%(138/140株)。Becker等[126]对256株曲霉分离株进行鉴定,有99.6%准确鉴定到了种的水平,而使用传统方法只有87.9%准确鉴定到种水平,唯一一株未被MALDI-TOF MS鉴定出来的菌株是因为在数据库中不存在该菌的谱图。Hettick等[130]使用MALDI-TOF MS获取了12种曲霉和5株不同的黄曲霉的谱图,对每个菌种的分类和每株曲霉的检测达到了100%的准确率。

所有的研究都强调,在使用MALDI-TOF MS系统时需要制备足够的样本量、根据已知菌对质谱图库的构建和质谱系统的独立性(在参考文献[121]中进行过综述)。目前FDA尚未批准使用MALDI-TOF MS对曲霉或其他丝状真菌鉴定的应用,工业界不大可能投资于加强丝状真菌的鉴定能力,目前正计划通过互联网开发一个经过策划、可公开访问的MALDI-TOF MS数据库[126]。

(九)分型系统

曲霉属的基因分型对了解临床与环境分离株之间的流行病学关系、确定院内感染的起源和传

播途径至关重要(见上文“流行病学与传播”),尤其在应对公共卫生状况方面[131]。基因分型也有助于判断经过较长时间后患者的分离株是同一菌株定植还是由其他菌株重新定植。可采取一系列的分子分型技术对曲霉进行分型,包括随机扩增多态性DNA(random amplified polymorphic DNA,RAPD)分析、限制性片段长度多态性(RFLP)分析、DNA指纹图谱、PCR指纹图谱、扩增片段长度多态性(amplified fragment length polymorphism,AFLP)分析、多位点微卫星分型(multilocus microsatellite typing,MLMT)、多位点序列分型(multilocus sequence typing,MLST)和细胞表面蛋白(cell surface protein,CSP)基因分型。大多数数据是基于烟曲霉的分型,使用基于微卫星分析(见下文)的短串联重复序列(short tandem repeats,STR)作为参考分型方法[132]。

RAPD分析曾用于区分烟曲霉[133]和其他曲霉菌,包括黄曲霉[134]和土曲霉[135]。RFLP分析同样也是最早应用于烟曲霉基因分型的技术,使用XhoⅠ和SalⅠ 2种内切酶,可对异源曲霉群中的菌种进行鉴别,其对黄曲霉分离株也进行过准确的鉴定[136]。DNA指纹图谱使用含有逆转录转座子样(retrotransposon-like)原件的探针进行基因分型,这些元件命名为Afut1、Afut2和Afut4[137-139],有的研究还使用黄曲霉种特异性探针pAF28对新生儿ICU病房的临床和环境分离株进行了成功的分型[140]。AFLP分析是另外一种可对烟曲霉进行基因多态性分析的方法[141],其也可对黄色组的曲霉[142]和黑色组的曲霉[143]进行分型。这些方法依赖于基于模式的分型技术,使得在实验室间的重复性很低,导致广泛应用受到阻碍,尤其是RAPD和AFLP。

先使用4个,后使用9个不同的微卫星标志物的MLMT分析为烟曲霉的基因分型建立了烟曲霉短片段重复序列(STRAf)的方案[132],这种方法的应用还拓展到了其他菌种如黄曲霉(6个或7个标志物[144-145])、黑曲霉(6个标志物)和构巢曲霉(7个标志物)[146-147]。更多近期的研究证实了其对黄曲霉高分辨率的分型结果[145-148]。Hadrich等[145]使用6个STR标志物,发现在63个临床分离株中,标志物AFLA1具有最高的鉴别能力(14个不同的等位基因;辨别值或D值,0.903)。STR分型也被用于土曲霉,使用一组包含8个STR的标志物对244株土曲霉进行检测,共鉴定出79个具有高辨别值的土曲霉复合群的基因型,将该方法用于63株澳大利亚的临床分离株的分析中,68.2%的菌株包含在3个基因型中[36]。Kathuria等[149]用STR标志物对印度的101株土曲霉复合群进行鉴定,得到了75个基因型。

一组含有7个基因位点的MLST分析也用于烟曲霉菌株的分型[150]。CSP分型[21]也是一种有用的分子工具,但比MLMT的分辨能力低。菌株变异是重复数变异和核苷酸序列变异共同作用的结果。在一项研究中,对烟曲霉株使用CSP分型与其他分型方法进行比较,包括使用小卫星(噬菌体M13的核序列)和微卫星[$(GTG)_5$和$(GACA)_4$]特异的单引物PCR指纹图谱及MLMT方法,结果只有MLMT方法可对来自一个暴发流行中所有临床和环境的菌株进行成功的分型[21]。

MLMT、MLST和CSP分型具有高度的可重复性并可得出明确简洁的数据。基于微卫星的方法和MLST分析是种特异性的检测。最近,一种新的基于表面蛋白编码基因外显子的高变串联重复序列的基因分型方法被报道可对烟曲霉进行高水平的鉴别,在126个无关菌株中得到了96个基因分型,D值为0.994[151]。最后,全基因组测序技术有很好的潜力为曲霉基因组的比较分析提供最先进的手段,包括对唑类药物耐药分离株的追踪[152]。

(十)血清学试验

曲霉半乳甘露聚糖(GM)及血清和其他体液中的曲霉特异性重组蛋白的检测在上文“抗原检测”中已有涉及。检测其他曲霉抗原或这些抗原的抗体的方法也已被开发出来,包括在皮肤试验中测定反应性,但它们的临床应用尚不明确[153],主要原因为长期存在的与抗原性质和纯度有关的问题。虽然有商品化的抗原可使用,但其质量参差不齐且与非曲霉抗原有交叉反应。然而,细胞杂交技术和单克隆抗体检测技术正在使曲霉病的免疫学诊断现状有所改观。特别是对曲霉菌特异性抗体的测定对于诊断慢性曲霉病、变应性支气管肺曲霉病和慢性肺曲霉病具有重要意义。

一些经详细阐述的曲霉抗原已作为免疫分析方法的评估对象[72,153-154]。曲霉的菌体抗原制备

包括：粗提或纯化的菌丝体全细胞提取物、曲霉代谢产物、甘露糖蛋白等，表达及纯化的重组抗原在最近也有应用。这些纯化的抗原中，一个 19 kDa 的碱性蛋白被证明是侵袭性曲霉病患者尿中主要的循环抗原[72]，这种蛋白也存在于肺曲霉球患者的血清中，随后的分子生物学特征表明其为 Aspf1，是一种与 mitogillin 家族细胞毒素相关的、可与 IgE 结合的蛋白(强力过敏原)。其他可能成为血清学诊断的抗原包括，18 kDa 核糖核酸酶、88 kDa 的二肽基肽酶、33 kDa 的碱性蛋白酶、重组的甘露糖蛋白抗原 Afmp1 和 Afmp2 及一种重组的 19 kDa 的铜-锌超氧化物歧化酶[153,155-156]，另一种曲霉蛋白，壳聚糖酶 CnsB，作为一种潜在的抗体诊断抗原也引起了人们的关注[157]。目前已采用各种不同的试验对这些抗原相应的抗体进行检测。双相免疫扩散和对流免疫电泳的方法从最初沿用至今，但这些方法已被商品化的酶联免疫分析(ELISA)及免疫荧光检测所取代[153,157]。

然而，相对于检测抗原，更多的血清学方法评估集中于检测对这些抗原的体液免疫反应。虽然许多研究显示这类检测较为敏感，但实验室间变异较大、不同真菌间存在交叉反应及试验所使用的抗原类型均限制了其常规的应用，或许最重要的原因是，免疫功能低下患者产生诊断性抗体的反应能力较差。但在一项研究中，使用 ELISA 方法对血清中抗烟曲霉特异性抗原 mitogillin 的 IgG 进行检测，32 例曲霉球患者均为阳性，42 例侵袭性肺曲霉病患者的阳性率为 64%(31/42)[158]，在健康志愿者中发现只有 1.3%的人群血清中存在曲霉的 IgG 和 IgM 抗体，但该 ELISA 方法最佳的临界值(cutoff 值)尚未确定。使用 ELISA 方法对 Afmp1 体液免疫的抗体进行检测发现，对曲霉球患者的敏感性高达 100%，但对侵袭性曲霉病的患者只有 33.3%[156]，Afmp1 和 Afmp2 抗体的联合应用可增加敏感性[159]。最近有研究显示对曲霉特异性抗原[硫氧还原蛋白还原酶(GliT)]的特异性总抗体进行检测，在非中性粒细胞缺乏的侵袭性曲霉病患者中的敏感性和特异性分别达到了 81%和 96%[160]。曲霉菌 IgG 抗体的检测对侵袭性曲霉病高危患者的诊断是否有临床价值尚不确定。一项研究发现，曲霉病患者对一些重组抗原的 IgG 基线反应高于对照组[161]，而另一个研究的结论是测定曲霉菌 IgG 水平没有实际价值[162]，需要进一步的研究来确定它们的诊断潜力。

然而，测定曲霉特异性抗体在慢性和过敏性曲霉病及曲霉球患者中有很大的用途，例如，检测循环抗体可能有助于囊性纤维化患者和真菌致敏的严重哮喘患者诊断 ABPA(表 122-3)。抗烟曲霉的 IgE 和 IgG 与烟曲霉抗原结合形成沉淀素是变应性支气管肺曲霉病的标志，也被纳入了变应性支气管肺曲霉病的诊断标准[153]。此外，免疫球蛋白亚类的测量也较有价值，最近，重组的烟曲霉变应原(如 rAspf 家族)特异性的 IgE 抗体以及胸腺活化调节趋化因子 TARC/CCL17 也被确定为 ABPA 新的生物标志物[163]。目前一致的观点是，至少在囊性纤维化的患者中对血清烟曲霉 IgG 亚类(尤其是 IgG4)的检测有助于对 ABPA 的筛选和分类，而对 IgA 的测定有助于 ABPA 预后的判断[163,164]，血清中 IgG4 的定量检测可提高诊断的特异性。此外，与抗体检测相比，生物标志物 TARC 检测对 ABPA 的诊断有更高的测试准确性，烟曲霉 IgE 和 IgG 抗体的检测有商品化的试剂盒如 ImmunoCap assay(Phadia，Uppsala，Sweden)和 Platelia Aspergillus IgG assay(Bio-Rad，Marnes-la-Coquette，France)。最近的研究发现，这 2 种 ELISA 试验在诊断 ABPA 时比对流免疫电泳(CIE)更灵敏(>93% *vs*. 63%)[165]。

新的检测曲霉菌抗体的方法已经成为可能。一项研究比较了间接血凝法检测曲霉菌凝集抗体(ELI. H. A. Aspergillus indirect Hemaggulation; EliTech Microbio，Signes，France)和琼脂双扩散系统检测曲霉菌沉淀素对诊断慢性肺曲霉病的效果，尽管滴度因方法而异，但阳性或阴性的试验结果一致性很好，EliTech 分析法(EliTech Microbio)快速、简便，但不易判读[153]。曲霉菌 Western blot-IgG 试剂盒(LDBiodiagnostics，Lyon，France)对非免疫受损宿主中慢性曲霉菌病的诊断敏感性为 88.6%，特异性为 84%[166]。然而，这些检测中的很多还未被 FDA 批准用于诊断。

(十一)药物敏感性试验

1. 侵袭性曲霉病的治疗用药 两性霉素 B、三唑类药物(伏立康唑、泊沙康唑和艾沙康唑)和棘白菌素类药物是侵袭性曲霉病的主要治疗用药，伊曲康唑可能在许多慢性疾病中更有作用。

从一项具有里程碑意义的随机对照试验研究得出的共识是，伏立康唑可作为侵袭性肺曲霉病及肺外和播散性感染[168]的一线治疗用药[167]。口服伏立康唑是降阶梯治疗和维持性治疗的首选。批准用于曲霉病治疗的其他抗真菌药包括两性霉素B脂质体制剂（例如，脂质体复合物，针对初始治疗或挽救治疗）[168]及棘白菌素类药物，但在许多国家只有卡泊芬净被批准用于该病的治疗[169]（也针对于初始治疗和挽救治疗）。泊沙康唑、两性霉素B和卡泊芬净用于挽救性治疗时有效率在40%～50%。最近，在侵袭性曲霉病的初始治疗中，艾沙康唑被证明非劣效于伏立康唑[170]，并且被FDA批准作为伏立康唑治疗此类感染的替代选择。虽没有足够的数据推荐在初始/挽救治疗中使用联合用药，但一项在确诊/拟诊为曲霉病的血液病患者的临床试验中发现，伏立康唑与阿尼芬净的联合使用与伏立康唑单独应用相比，有提高患者生存率的趋势[171]。对曲霉病详细的治疗方案，可参考2016年美国感染病学会（Infectious Diseases Scoiety of America，IDSA）指南[168]。

2. 抗真菌药物体外药敏试验 曲霉分离株的体外药敏试验有助于对治疗的指导。唑类药物是治疗曲霉病唯一一类有效的口服药物，对其耐药曾经是罕见的，仅限于长期接受唑类药物治疗或预防的患者，在一项研究中发现，伊曲康唑的长期使用与泊沙康唑的高MICs呈正相关[172]。鉴于在一些国家的临床和环境中分离的烟曲霉株越来越多出现对唑类药物耐药的现象[173]，在这些地区常规开展曲霉的药敏试验对临床治疗决策和耐药性监测是非常重要的。唑类药物耐药的发生率在欧洲相对较高，在世界其他地区的发生率也不尽相同（0.55%～11.2%）[174]。国际性监测研究ARTEMIS的数据为5.8%[175-176]，英国高达20%[173]，荷兰和德国为20%～30%[174,177]。对烟曲霉以外的其他新种和隐形种药物敏感性模式的了解也同样重要，因其耐药率可达40%[33]。

烟曲霉（也包括其他曲霉属）对唑类药物产生耐药的主要机制为甾醇14a-去甲基化酶（或Cyp51）靶位蛋白的改变抑制了其与药物的结合，这些改变是由于编码蛋白的基因*CYP51A*单核苷酸多态性使得氨基酸替换所导致的。导致耐药的突变热点位于氨基酸序列的G54和L98，此外，L98的突变需要和*CYP51A*基因启动子区有一个串联重复（TR）称之为TR/L98突变来导致耐药[173]。唑类及棘白菌素类药物的耐药机制（第133章）。

3. 方法学和MIC检测 过去的几年，2种对产孢丝状真菌标准化的药敏方法提供了曲霉药敏试验方法的指南。这2种方法为：①美国临床实验室标准化研究所（CLSI）M38-A2标准；②欧洲抗菌药物敏感性试验委员会（EUCAST）标准[178,179]（第134章）。不管采用哪种方法，对唑类药物MIC（最低抑菌浓度）的判读均采用相对直接的方法，对两性霉素B采用生长或完全抑制生长的判读模式，使用这些参考方法获得的MIC值吻合性很高。

目前CLSI尚未建立曲霉对任何抗真菌药物敏感性或耐药性的折点解释标准，但两性霉素B、伊曲康唑、伏立康唑、泊沙康唑和棘白菌素类药物对曲霉有体外活性，且显示有很低的MIC值[33,180]。使用EUCAST方法，两性霉素B、伏立康唑、泊沙康唑、伊曲康唑和最近的艾沙康唑的临床折点（clinical breakpoints，CBPs）已经发表，主要是针对烟曲霉[181-184]；针对于野生型的曲霉菌株的流行病学界值（epidemiological cutoff，ECOFF）的MICs也已发布[183-185]（第134章）。

重要的是，MICs可能与不同菌种以及来自不同地理区域有关，土曲霉对两性霉素B被认为是耐药的，因其缺乏药物靶位，MICs高达16 μg/ml，对土曲霉一般不需进行两性霉素B的药敏试验。与烟曲霉引起的感染相比，土曲霉引起的感染对使用两性霉素B治疗的效果较差。总体来讲，两性霉素B对曲霉的MICs与临床治疗效果没有明显的相关性，由于没有明显的耐药表型产生，其MICs分布在一个很窄的范围内[186]。

早期有对唑类药物MICs与临床结果相关性的研究，结果显示，高MICs与使用唑类药物对侵袭性曲霉病动物模型治疗失败之间有很好的相关性[187]。最近有研究报道，伏立康唑的MICs可预测土曲霉感染的小鼠的治疗效果[188]。然而在另一项研究中，伏立康唑MICs的升高与烟曲霉感染小鼠的治疗效果没有相关性[189]。Baddley等[190]观察到，在伏立康唑的MICs超过ECOFF（即1 μg/ml）时，其与接受伏立康唑治疗的烟曲霉感染的患者死亡率增加没有相关性，对其他曲霉属菌种，唑类药物的MICs与治疗结果之间的相关性也

未确定[191]。尽管如此，在 MICs 非常高(例如，伊曲康唑的 MIC 为 16 μg/ml)的患者中，病死率可能高达 88%。

由于显著的拖尾生长，使用 CLSI 的方法进行棘白菌素类药物对烟曲霉敏感性试验的终点难以判断。因此，引入了最低有效浓度(minimum effective concentration，MEC)，MEC 即为导致菌株在宏观上异常生长的最低浓度，体现在与生长对照孔相比，出现微小菌落或颗粒状生长。MEC 的测定比较耗时，需要使用显微镜来确定菌落形态的变化，实验室间的重现性不佳。MEC 与体内治疗效果的相关性还不明确。有报道发现，在使用一株 MEC 处于野生型范围的曲霉构建的动物模型中，出现了治疗失败和体内耐药的现象[192]。目前 EUCAST 没有对于棘白菌素类药物的 CBPs。

在实践中，这 2 种药敏参考方法可以由真菌实验室的专家进行操作，但其不适合在大多临床实验室中开展，因其需要经过大量的培训。曲霉药敏试验的商品化试剂如 Etest(AB Biodisk，Solna，Sweden)也较常用。Etest 法检测伏立康唑与 CLSI 的参考方法有非常好的相关性[193]，对伊曲康唑和泊沙康唑的一致率在 80%～100%[194-195]。Sensititre Yeast YO10 试剂盒[含有包被 9 种抗真菌药的 96 孔板(Trek Thermofisher Diagnostics，Cleveland，OH)]也以 CLSI 方法为基础，其终点的判读更加容易，对唑类药物、两性霉素和棘白菌素类药物的结果与 CLSI 有很好的相关性[195]。另外一种方法为使用含唑类药物的琼脂培养基，如多孔监测板(VIPcheck，Nijmegen，the Netherlands)(第 133 章)，来筛选唑类药物的耐药，这种技术已对烟曲霉耐药的筛选进行过评估[173]。唑类药物之间的交叉耐药可达 74%[173,176]。此外，研究方法还包括实时药敏试验的等温微量热法(isothermal microcalorimetry)[196]。许多专业实验室也对烟曲霉的基因型敏感性进行试验(第 134 章)。

(十二)结果的评价、解释和报告

具有诊断能力的真菌实验室的目标是使用准确、最新的方法提供及时、有临床价值的信息。欧洲癌症研究和治疗组织/侵袭性真菌感染协作组(EORTC/MSG)推荐了在临床试验中对患者数据分析的标准，这有助于结果解释的规范化。当曲霉分离自无菌标本和分离自侵袭性曲霉病的高危患者时，需将其鉴定到种的水平，因为某些菌种对抗真菌药物可能更耐药，如土曲霉复合群对两性霉素 B 耐药，而与烟曲霉相比，构巢曲霉复合群和焦曲霉对许多药物的敏感性较低[53,197]。分离自免疫功能正常患者非无菌部位标本(包括支气管肺泡灌洗液)的曲霉可能与疾病无关，通常不需鉴定到种，而对分离株的工作流程应取决于申请医生和微生物学家的沟通。

因为临床和影像学表现不特异，诊断侵袭性曲霉病较为困难。虽然从临床标本中或培养后看到曲霉是较简单的诊断方法，但通常更依赖于在适当的宿主危险因素、临床表现和影像学结果的情况下结合非培养的结果进行诊断。当尚未做出诊断时，对曲霉病高危的患者传统的手段是给予经验性的抗真菌治疗。然而，随着可以使用的感染生物标志物的增加及应用的增加(尤其是曲霉 GM 试验和 PCR 方法，单独或联合使用)，使得采取抗真菌药物抢先治疗的现象在增多。利用这些生物标记物，在可行性研究中对感染进行前瞻性筛查，包括一项随机对照临床试验，证明了进一步诊断的作用[96,103]，并在不降低死亡率的情况下早期诊断曲霉病。

尽管 EUCAST 在发展的过程中规定了抗真菌药物的 CBPs 和 ECOFF 值，但 MICs 与临床治疗效果之间的关系尚未建立，对曲霉属 MIC 试验的解释依然存在问题。然而，一些国家中烟曲霉对唑类药物耐药性有升高的趋势，在这些地区以及在治疗失败时，对唑类药物进行敏感性试验是必要的。由于需要专业知识和试验操作的培训，EUCAST 药敏试验方法的广泛应用受到了限制。将真菌鉴定到种的水平(如迟缓曲霉)可推测抗真菌药物的敏感性，这也是比较有价值的。

二、篮状菌属和青霉属

(一)马尔尼菲篮状菌(*Talaromyces marneffei*)[以前称为马尔尼菲青霉菌(*Penicillium marneffei*)]的分类学和定位

早期对青霉属(指广义的青霉属)的分类主要基于 Thom[198]、Raper 和 Thom[199] 的研究，属内包含 250 余种青霉菌(http://www.aspergillus-

penicillium. org)，根据这些菌种的形态学特征，尤其是分生孢子梗的分枝，传统的分类学将其分为 4 个无性型的亚属[类曲霉亚属(*Aspergilloides*)、叉状亚属(*Furcatum*)、青霉亚属(*Penicillium*)和双轮亚属(*Biverticillium*)]，这 4 个亚属均归属于发菌科(*Trichocomaceae*)[4,200]。但近期的多基因系统发生学分析表明这 4 个亚属中有 3 个(类曲霉亚属、叉状亚属和青霉亚属)(即为狭义的青霉属)是多谱系演化的，而双轮亚属形成了 1 个单谱系类群[201]，其特点是存在对称的双轮生分生孢子梗[202]。双轮亚属独特的形态学和生理学特征导致其在分类学中的定位不断变化，有文献建议将其从狭义的青霉属中分出[4,200-202]。

将双轮亚属从广义的青霉属中分离出来的理论：广义的青霉属与 2 个有性型的菌属有关：正青霉属(*Eupenicillium*)(等同于目前狭义的青霉属)和篮状菌属(*Talaromyces*)(目前认为是双轮亚属的有性阶段)。区分这 2 个有性型菌属主要依靠子囊果，狭义的青霉属具有菌核样的子囊果，为壁厚、等径的细胞，成熟需几个月的时间，多数不形成子囊孢子，而篮状菌属子囊果的特征是较软的细胞壁中含有多层交织的菌丝，可在数周内成熟。与狭义的青霉属相比，篮状菌属中的菌种常有深绿色分生孢子，气生菌丝产色素且被包绕，菌落背面为黄色、橙色或红色到紫色。此外，依据真菌 rRNA 和钙调蛋白基因进行的遗传相关性系统发生的研究提供了更多的证据来证明狭义的青霉属和篮状菌属被认为属于不同的亚科[203-206]。最终用多基因方法确认了这些菌属所在的亚门[201]。

与上文中提到的"曲霉属"一样，现代的分类学工具有能力将无性型菌属和其有性型关联起来，让一种真菌只有一个名称[10]。随着有性型菌株比无性型菌株优先命名规则的取消[11]，对人们以前所谓的青霉属同样产生了很大的影响。青霉属这个名称目前指狭义的青霉属(即包含类曲霉亚属、叉状亚属和青霉亚属)，而篮状菌属目前被确认为一种多形态的菌属，无性型的代表菌种属于以前我们认为的双轮亚属[207]。

值得注意的是，目前只有 1 个已知菌种对人类和动物致病，即为双轮亚属中的马尔尼菲篮状菌(以前称为马尔尼菲青霉菌)。此菌为双相型，在 37 ℃宿主体内形成酵母相，在 25 ℃环境条件形成菌丝相。作为修订命名的结果，马尔尼菲篮状菌(Segretain，Capponi & Sureau) Samson，Yilmaz，Frisvad & Seifert，comb. nov. MycoBank MB560656[207-208]代替了马尔尼菲青霉菌[Segretain，Capponi & Sureau apud Segretain(1959)]作为新命名系统的有效名称。

(二)流行病学与传播

马尔尼菲篮状菌在亚洲的热带地区，尤其是泰国、印度东北部、中国、中国香港、越南和中国台湾等地产生了特定的健康问题[209-212]。尽管该病主要见于 HIV/AIDS 患者[209]，但随着全球对 HIV 感染更好的控制，其流行病学正在发生变化。非 HIV 感染者，包括细胞介导的免疫缺陷者、接受单克隆抗体(如抗 CD-20)和激酶抑制剂治疗的患者也成为易感者[213]。其在 HIV 感染中的存在即为定义 AIDS 的疾病。

马尔尼菲篮状菌的生态学源头仍然未知，关键问题在于人类的感染是动物源性的还是来源于腐生(环境)传播，虽然马尔尼菲篮状菌最初是从中华竹鼠体内分离到的(越南，1956 年)[214]，但暴露于土壤和腐烂的材料，特别是在潮湿和多雨的条件下可能是关键的危险因素[209]，而从事农业活动与风险的增加并没有关系[215]。尽管通过大量的努力从土壤中分离此菌，但结果并不理想[209,216]，且依然未证明其来源于环境。相反，已从竹鼠属(*Rhizomys*)和小竹鼠属(*Cannomys*)生活的环境中分离到马尔尼菲篮状菌，表明这些啮齿类动物是此菌生命周期中的一个重要环节，使用 MLMT 分析方法对这些菌种进行基因分型表明，竹鼠分离株与人类分离株有相同的基因型[209,217]。这说明人类的感染可能来自携带菌种的啮齿类动物，也存在人类和啮齿类动物的感染均来自于目前未知的环境感染源的可能。

患者吸入马尔尼菲篮状菌分生孢子可引起感染，肺泡巨噬细胞是主要的宿主防御。在免疫功能正常的宿主体内，真菌在吞噬细胞内繁殖，导致肉芽肿的形成；在 HIV/AIDS 感染者中，通常感染 $CD4^+$ 细胞计数<50 个/ml 的晚期患者。

(三)临床意义

马尔尼菲篮状菌目前是地方性 HIV/AIDS 患者常见的条件性感染排第 3 位的病原菌[186]，在 HIV 感染上升的地区，其患病率也有所上

升[209,218]。尽管不常见，但在其他免疫功能低下的患者中，包括肾移植和系统性红斑狼疮患者及原发性或获得性免疫缺陷患者中，也有感染的报道[213,218-220]。若免疫功能抑制的患者有前往流行区的经历，需警惕马尔尼菲青霉菌病的发生[221]。HIV/AIDS患者（尤其在CD4计数低于100×10^9/L）中发生的播散性感染主要侵袭皮肤（占60%～85%）、肺（肺炎，包括形成空洞）、肝脏和关节，多数有发热、体重减轻、淋巴结肿大和皮肤损伤的表现，皮肤损伤多发于面部、颈部和口腔，但也可发生于其他部位如躯干和生殖器[209]，皮损通常为中央坏死的脐状丘疹，但不典型，肉色无坏死[222]。

病原菌可分离自皮损、血液、骨和骨髓，在皮损的瑞氏染色涂片或其他部位活检组织标本中观察到马尔尼菲篮状菌酵母样细胞即可进行初步诊断[223-225]。

(四)标本的采集、运输和储存

标本的采集、运输和储存的方法与其他病原性真菌类似（第117章）。

(五)直接检查

显微镜检查 直接观察到病变部位组织或细针穿刺抽吸标本中的菌体可做出初步诊断；对肺活检组织印片、肺穿刺物、淋巴结穿刺物、皮肤涂片甚至痰标本进行细胞学检查可做出快速诊断；可通过六胺银或过碘酸雪夫染色观察到典型的酵母相菌体，也可使用吉姆萨染色和HE染色的方法[225-226]；在不明原因发热的HIV阳性患者中，进行骨髓穿刺液的瑞氏染色对诊断也较有价值。阳性的组织细胞学标本中有（或无）肉芽肿的形成，可能含有少量到大量的细胞内酵母相细胞[225]，呈卵形到椭圆形（直径3～8 μm），中间具有明显的横隔[226]，这种具有横隔且不出芽的方式有助于区别组织胞浆菌病和弓形体病[14,224]。一种使用兔抗体与马尔尼菲篮状菌抗原结合的特异的间接免疫荧光抗体试剂已被研发出来，其可对马尔尼菲篮状菌进行快速鉴定[227]。

(六)核酸检测

一些分子生物学技术已用于临床标本中马尔尼菲篮状菌的直接检测和鉴定，其中许多为自建方法，这些方法包括使用单步PCR、巢式PCR技术对PE组织、皮肤、血液和其他标本中的马尔尼菲篮状菌进行检测。多数检测的靶位是马尔尼菲篮状菌的18S rRNA和ITS基因区域[228-230]。有研究对使用18S rRNA巢式PCR直接鉴定PE组织中的马尔尼菲篮状菌的方法进行了评估，该方法使用了马尔尼菲篮状菌特异的内引物（Pm1和Pm2），扩增的种特异性片段约为400 bp，从14名马尔尼菲篮状菌感染的患者和10例被感染竹鼠的组织中均获得了阳性结果，分析的敏感性为14 fg/μl[229]。在随后的研究中，采用同样的方法在小鼠感染模型的BALF及新鲜肺组织中也成功检测到了马尔尼菲篮状菌的DNA，显示了很好的敏感性和特异性[230]。其他的研究中，使用多重连接探针扩增技术对PE组织中的马尔尼菲篮状菌DNA进行检测显示了较高的特异性[231]，环介导等温扩增技术也有较好的应用[232]。最近Hien等[233]评估了一种实时荧光定量PCR在AIDS合并青霉菌病患者血浆中马尔尼菲篮状菌*MP1*基因的检测方法，诊断敏感性为70.4%，特异性为100%，每毫升血浆中最低检测限为100个马尔尼菲篮状菌。*MP1*基因编码马尔尼菲篮状菌细胞壁上一种特异性的甘露糖蛋白[234]。

(七)分离程序

虽然培养的方法较慢，且需要侵入性操作来采集临床标本，但其依然是诊断的金标准。从临床标本中较容易培养出马尔尼菲篮状菌，其在不含放线菌酮的SDA（sabouraud dextrose agar）培养基上生长良好；骨髓培养的敏感性最高（100%），其次为皮肤培养（90%）和血培养（76%）[212]。在37 ℃脑心浸液琼脂上传代培养可使菌丝相转化为酵母相[226]。马尔尼菲篮状菌的鉴定主要根据菌落形态（见下文）。在欧洲、澳大利亚和新西兰，马尔尼菲篮状菌被归类为第3级生物危害（RG-3）病原体，对实验室工作人员有潜在的生物危害。因此，应在3级（或以上）防护设施中处理标本和培养物，避免吸入分生孢子或发生皮肤的意外接种。

(八)鉴定

篮状菌属是实验室中普遍存在的丝状真菌，较易从多数非无菌标本（尤其是呼吸道标本）中培

养出来。区别马尔尼菲篮状菌和其他青霉菌通常不困难，因为马尔尼菲篮状菌具有双相型，在37 ℃可从菌丝相转化为酵母相，而在25 ℃可从酵母相转为菌丝相。

菌落在25 ℃ SDA培养基上生长速度快、白色绒毛状带有淡黄绿色分生孢子头，成熟后菌落变为浅灰褐色到棕色，并产生可扩散的棕红色色素，尤其在培养基背面更清晰(图 122-4)，这是马尔尼菲篮状菌早期的特点。但有些非致病的青霉菌也可产生红色色素，如桔青霉(*P. citrinum*)、微紫青霉(*P. janthinellum*)、产紫青霉(*P. purpurogenum*)和红色青霉(*P. rubrum*)。37 ℃脑心浸液琼脂培养可见粗糙到光滑、黄褐色菌落，酵母样细胞在镜下的形态为球形到椭圆形，直径 2～6 μm。

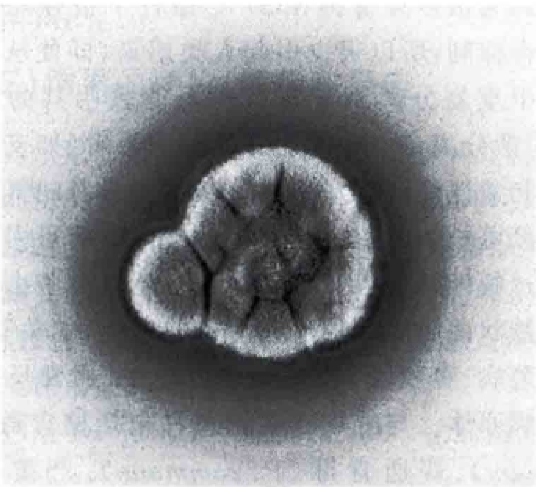


图 122-4　25 ℃ SDA培养基上马尔尼菲篮状菌的白色菌落，存在黄绿色分生孢子头。成熟后产生可扩散的棕红色到酒红色色素，见彩插

马尔尼菲篮状菌的形态独特，具有透明、细胞壁光滑的分生孢子梗，末端轮生体包含3～5个带有分生孢子的梗基(二级分枝)，每个梗基生成3～7个瓶梗，分生孢子球形到近球形，直径2～3 μm，细胞壁光滑，由瓶梗产生并向基性生长成链状，形成典型的"帚状枝"或毛刷样果实的结构[14,226]。

除了直接对临床标本中的真菌检测外，分子工具还可以通过PCR结合DNA测序或探针杂交对马尔尼菲篮状菌培养物进行鉴定，并与可能偶然出现的其他青霉属菌种区分开。由于在青霉属和篮状菌属内进行菌种鉴定存在困难，故推荐一种多相的方法，即形态学与分子生物学相结合的策略。分子检测通常对18S rRNA、ITS区、β-微管蛋白基因、钙调蛋白基因、肌动蛋白基因或RNA聚合酶基因中的一个或多个进行扩增[209]，此类鉴定方法的应用主要取决于临床的需要。MALDI-TOF MS用于菌丝相和酵母相的鉴定也被研究。然而，正确的鉴定依赖于参考谱图的获取，目前商业数据库中还没有马尔尼菲篮状菌的参考谱图可用[235]。

(九)分型系统

大量的分型系统被用于：①对马尔尼菲篮状菌群体结构和遗传多样性的研究；②调查感染的聚集。使用23个基因位点[236]的多位点微卫星技术(MLMT)对分离自东南亚的临床菌种进行分析，结果显示有21个基因位点存在多态性，从而揭示了高度的遗传多态性。分离自东部地区(中国、中国香港、印度尼西亚)的菌株与西部地区(泰国、印度)有明显的不同，东部地区的分支具有比西部分支更广泛的多态性[236]，1项独立的研究也显示这些地区菌株的聚集存在2个不同的支系[237]，造成不同支系产生的原因可能为这些种群的潜在隔离或其他未知因素。

除了MLMT，包含8个基因位点的多位点序列分析(MLST)也被用作分型的手段进行评估，包括转录因子(*AbaA*)、触酶(*CpeA*)、同源结构域转录因子(*StlA*)、异柠檬酸裂解酶(*Icl1*)、多芳香氨基酸合成酶(*PAA*)、依赖于NADH的谷氨酸合成酶(*NGS*)、洛伐他汀九酮合成酶(*LNS*)、一种细胞壁甘露糖蛋白(*MP1*)和马尔尼菲篮状菌线粒体基因组的细胞色素氧化酶亚基1(*COX1*)基因的一个片段等基因。在一项研究中，*COX1*、*AbaA*和*NGS*位点未显示出核苷酸多态性，然而其他5个位点显示出高度的基因多态性，再次表明分离自中国和泰国的菌株存在地理间隔，但也有支系的混合。不同患者分离株存在相同的MLST分型则支持菌株存在无性繁殖模式[238]。

(十)血清学试验

尽管没有标准的商品化试剂，但血清学试验有助于马尔尼菲篮状菌感染的诊断，血清学试验可检测抗体、抗原或对两者均检测，标本为血清和其他体液，方法有免疫扩散法、间接免疫荧光法和ELISA法[209,223]。

免疫扩散法是使用马尔尼菲篮状菌的菌丝外

抗原来检测抗体的沉淀反应试验,但对于HIV阳性患者血清的检测敏感性较低[239]。有研究使用间接免疫荧光法对出芽分生孢子和酵母相菌体的IgG抗体进行检测,结果显示马尔尼菲篮状菌感染者的滴度较未感染者高(>160 *vs.* ≤40)[240]。一种使用重组的马尔尼菲篮状菌甘露糖蛋白(Mp1p)检测抗体的ELISA试验对感染诊断的敏感性为65%~80%,特异性为100%[234,241],但将检测Mp1p抗原和抗体的方法结合起来应用会使敏感性、阳性预测值和阴性预测值分别达到88%、100%和96%[241]。在另一项研究中,用类似的双抗体夹心ELISA检测Mp1p抗原可以对9.3%的HIV感染者诊断为播散性青霉病[242]。

马尔尼菲篮状菌特异性的乳胶凝集试验也是检测血清抗原的一种方法(敏感性为76%),当与免疫扩散试验联合应用时,敏感性可增加到82%,特异性可达100%[239]。使用烟曲霉单克隆抗体检测GM的ELISA试剂盒Platelia *Aspergillus* 已很少出现假阳性结果[243]。此外,自建的ELISAs方法和乳胶凝集法也同样被应用在尿中马尔尼菲篮状菌抗原的定性和定量检测,显示了高敏感性和特异性(在滴度1:40作为临界值时,敏感性为94.6%~97.3%,特异性>97%)[244]。在一项使用ELISA捕获法对53例经培养确诊为青霉菌病的患者和240例对照进行评估的试验中,血清学诊断的敏感性、特异性和准确性分别达到92.45%、97.5%和96.59%[245]。

(十一)抗菌药物敏感性试验

马尔尼菲青霉菌病的早期治疗是降低感染死亡率的关键因素。尽管马尔尼菲篮状菌对抗真菌药还没有正式的临床折点,但体外敏感性试验有助于治疗的指导。体外试验似乎表明马尔尼菲篮状菌对伊曲康唑、酮康唑、氟胞嘧啶、伏立康唑和泊沙康唑较为敏感,对两性霉素B敏感性不高,对氟康唑敏感性最低。一些菌株对氟康唑的MICs较高(高达16 mg/L),被认为耐药[246-247]。对分离自中国的39株马尔尼菲篮状菌进行药敏试验,结果显示伏立康唑的MICs较低[MIC值范围0.004~0.25 mg/L;MIC的几何均值(GM)为0.04 mg/L],伊曲康唑、特比萘芬、两性霉素B和氟康唑的MICs几何均值分别为0.11 mg/L、0.15 mg/L、<0.65 mg/L和4.1 mg/L[248]。最近的一项研究评估了马尔尼菲篮状菌对泊沙康唑的敏感性,与其他药物相比,泊沙康唑对酵母相和菌丝相都表现出良好的活性(MIC范围分别为0.001~0.002 mg/L和0.004~0.063 mg/L)[246]。临床反应似乎与唑类药物的敏感性有关,一项对HIV患者的回顾性研究表明,伏立康唑对马尔尼菲篮状菌播散性感染有效且患者的耐受性好[249]。两性霉素B的结果较难评估,但两性霉素B、伏立康唑和伊曲康唑都被用于治疗青霉病。棘白菌素类药物对马尔尼菲篮状菌也有活性,在体外试验中其对菌丝相的活性高于酵母相[246-247]。米卡芬净与伊曲康唑(65%的菌株)和两性霉素B(50%的菌株)显示有协同作用,但不与氟康唑产生协同[250]。

(十二)其他青霉属(和篮状菌属)菌种

因为很多青霉菌在37 ℃条件下被强烈抑制或完全抑制,所以很少引起人类感染,即便从患者标本中重复分离到青霉菌也不能表明其为致病菌,包括分离自一些慢性肺部疾病患者(如支气管扩张和囊性纤维化)的菌株,在这些患者的气道内青霉菌可长期定植。已证实的是青霉菌可引起过敏和过敏性肺炎[251]。尽管如此,还有一些由青霉属和篮状菌属的菌种引起感染的报道,如角膜炎、耳真菌病、腹膜炎、肺炎和心内膜炎,通常反复分离出病原体。与感染有关的菌种包括桔青霉(*P. citrinum*)、普通青霉(*P. commune*)、产黄青霉(*P. chrysogenum*)、桔灰青霉(*P. aurantiogriseum*)、短密青霉(*P. brevicompactum*)、疣孢篮状菌(*T. verrucosum*)、*T. piceus*、紫色篮状菌(*T. purrurogenus*)和褶皱篮状菌(*T. rugulosus*)[14,252]。

对青霉属菌种的鉴定需熟知菌株在不同培养基上的生长形态,以及具备细致的显微镜检查的专业知识和经验。这类菌株不具双相性,可将其点种(3个点)在察氏琼脂、2%麦芽浸汁琼脂和(或)25%甘油硝酸盐琼脂中,于25 ℃培养。菌落生长快速,在出现绿色的部分(有时为白色)含有密集的分生孢子。多数菌种在7天内产孢。显微镜检查最好使用透明胶带旗帜法或玻片小培养法准备所观察的菌株,覆盖在滴有乳酸酚棉兰的载玻片上,再使用一滴酒精擦去气泡和多余的分生孢子。对于菌种的鉴定可能需要分子生物学的技术。基于ITS1/2区序列的青霉菌系统发生树(图122-5)。

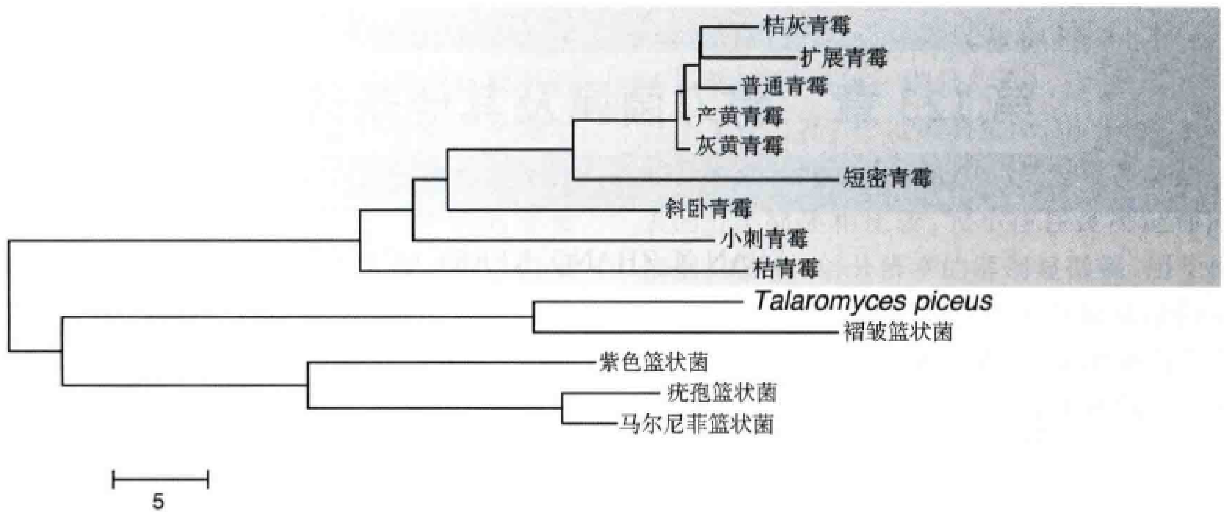


图 122-5 采用邻接法构建的病原性青霉菌和篮状菌的系统发生树，根据临床真菌学图谱(*Atlas of Clinical Fungi*)4.1 版本(http://www.clinicalfungi.org)，基于从 GenBank 获取的 rDNA 内转录间隔区(ITS1/2)的基因序列，使用程序 MEGA7.0 版本进行分析[253]，见彩插

(十三)结果的评价、解释和报告

马尔尼菲篮状菌是篮状菌属中唯一与人类感染有确切关联的菌种。目前，由这种真菌引起感染的诊断应至少包括一个阳性培养、直接涂片、分子检测及对有可靠病史和接触史患者的确认。多数其他的青霉属/篮状菌属的菌种引起人类感染的可能性很低。

感谢 David Ellis 在图 122-3b～g 和图 122-4 的准备中给予的慷慨帮助，也感谢 Jos Houbraken、Sybren de Hoog 和 John Taylor 对当前分类法的有益评论，以及 Carolina Firacative 在图 122-1 和图 122-5 的准备中给予的帮助。

参考文献请扫二维码查阅

第 123 章　镰刀菌属及其他条件致病性透明真菌

SEAN X. ZHANG, KERRY O'DONNELL, DEANNA A. SUTTON

（廖康　译；李轶、陆玲　审校）

条件致病性透明或淡色的霉菌由系统发育各异的一组菌构成，包括常见和少见、无性生殖和有性生殖的真菌。这些真菌通常是土壤、空气或植物残体中的腐生菌或兼性的植物病原菌。其中有些霉菌可从患者标本中分离到，但没有任何临床意义；另一些霉菌虽然很少能从患者标本中分离到，但足以挑战临床实验室的诊断水平，因此，对于检出这类霉菌的临床意义必须设立相应的临界评估。尽管本章内容也涉及某些具有淡色或暗色分生孢子的菌属，但是本章的重点是关注那些在组织中产生透明或淡色的有隔菌丝的真菌。

"镰刀菌病（fusariosis）"一词是指由镰刀菌属（*Fusarium*）引起的感染[1]（表 123-1），但这种根据真菌菌属来命名疾病对于一些不常见或罕见的真菌来说是不恰当的。真菌的种类繁多，不是所有的菌种都能归类到既有真菌病的致病菌谱中。此外，当真菌的命名发生改变时也会引起问题。为避免这种情况，建议将真菌病分为 2 组：透明丝孢霉菌病和暗色丝孢霉菌病[2]。虽然这样的分组定义包含了相似的临床症状，但其区别在于组织中的无隔菌丝细胞壁内是否存在色素或黑色素，没有则为透明丝孢霉病，有则为暗色丝孢霉菌病。然而，有些真菌，如赛多孢霉属和新双间柱顶孢［原名双间柱顶孢（芒果纳特拉斯酵母菌）］[3]，它们会在体外形成黑色菌落和分生孢子，在组织内

表 123-1　镰刀菌感染的分类[a]

Ⅰ. 正常宿主	K. 腹膜炎（持续性非卧床腹膜透析）
A. 角膜炎	L. 导管相关性真菌血症
a. 角膜创伤与穿透	M. 器官受累与否的真菌血症
b. 软式隐形眼镜、溶液、容器的污染	N. 肺炎
c. 糖皮质激素的使用导致局部免疫抑制	O. 鼻窦炎
B. 甲真菌病[b]	P. 化脓性关节炎
a. 女性远端趾甲破损	Q. 血栓性静脉炎
b. 侧位甲下甲真菌病	R. 眼内炎
c. 近端甲下甲真菌病	S. 骨髓炎
d. 近端甲皱甲沟炎样反应	Ⅱ. 免疫抑制宿主
C. 皮损溃烂[b]	A. 化脓性眼内炎
D. 足癣[b]	B. 鼻窦炎
a. 交叉感染	C. 肺炎
E. 足底过度角化破损[b]	D. 皮肤受累
F. 皮肤感染[b]	E. 真菌血症
G. 外科伤口感染	F. 播散性感染
H. 烧伤	G. 脑脓肿
I. 溃疡	H. 腹膜炎
J. 中耳炎	

注：[a] 摘自参考文献[60][69][76][105]。本章中讨论的其他真菌感染的患者可能出现类似的临床症状，并在组织中的真菌结构可能类似于黄曲霉。[b] 皮肤癣菌未被分离的患者

产生透明或浅色素的菌丝。类似的，有关报道提出了罕见的镰刀菌病能在体内和体外产生黑色素的菌落[4]。Fontana-Masson 染色有助于检测组织中真菌成分的黑色素沉着，但结果不是十分确定(见第 118 章的讨论部分)。有些真菌的色素不稳定，染色可能偏淡或不均一。实际上疾病名称是按照在体外透明或有色素的真菌来确定的。由于真菌性疾病种类繁多，这种用术语来命名可能效果不错，但用颜色进行分类还是有很多不足之处。因此，国际人兽共患医学真菌学会(International Society for Human and Animal Mycology, ISHAM)下属委员会建议，真菌性疾病的命名应包括疾病特有的病理描述和病原体，例如，由某某真菌引起的皮下囊肿[5-6]。

一、分类与鉴定

条件致病性透明真菌的种类不断增加，大部分菌种在培养时不会产生有性繁殖(减数分裂或有性阶段)，此类真菌主要包括无性繁殖的子囊菌门和担子菌门，以及一些无有性阶段的种属(第 116 章)。如今，通过一些方法可以获知许多无性真菌和与其有亲缘关系的有性真菌之间的关系，如发现无性真菌的有性阶段或通过系统发育的 DNA 序列数据分析来推断，这对于了解真菌间的关系极其重要。在真菌系统发育分类中可以将无性真菌和与其有亲缘关系的有性真菌放在一起。真菌分类学的快速发展大大改变了以往种和属的概念，尤其是镰刀菌(*Fusaria*)[7-17]。有性型真菌可能是从具有同宗配合、自我繁殖能力的菌种演化而来(第 116 章)，但如果没有专用培养基和延长培养时间，很难获得这类真菌。然而，根据最近对多形性真菌命名的修改意见，自 2013 年 1 月 1 日起，禁止使用双重命名原则[18-19]，同时也有一些以往公认的分类将会修改。其中一个最主要的变化是镰刀菌各个有性阶段只有一个统一的命名"镰刀菌属(*Fusarium*)"[20]，这可能是由于不到 20%的镰刀菌会存在有性繁殖的缘故。迄今为止，已研究的大多数镰刀菌都被认为是自不育或异宗配合，因为交配型的 PCR 检测表明，它们只拥有有性生殖所需的 2 个交配性(即 MAT1-1 和 MAT1-2)中的 1 个[21]。

本章大部分的致病性霉菌都属于丝孢纲(即产生游离分生孢子的物种)[22-24]。丝孢纲真菌的表型鉴定是基于分生孢子的形态和分生孢子发生的机制(孢子发生；第 116 章)。实际观察时必备以下 3 种工具：① 目镜测微尺，用于测量分生孢子和有性孢子的大小。霉菌的鉴定往往需要与已发表的分类描述相比较，大小往往是决定种的重要依据。② 60 倍分辨率的解剖显微镜，用于检测培养皿上或试管里菌落产生的有黏性头部的或链状的分生孢子，以及壳细胞、菌核、孢囊或气生菌丝及嵌入琼脂中的有性子实体等特殊结构。③显微镜制片技术，用于观察真菌分生孢子形成过程。玻片培养法对一些真菌的鉴定来说很有用，特别是那些产生体积小且脆弱的分生孢子的真菌[25-26]。但像木霉那种生长速度快的真菌应尽早检查。形态学特征在鉴定产分生孢子的真菌时很重要，通常包括以下几个方面：①分生孢子大小、形状、隔膜类型；②分生孢子的颜色(无色透明或者暗色)；③孢子发生的发展过程，包括产孢细胞的性质；④分生孢子释放机制；⑤载孢体的结构。分生孢子的形状和分隔的不同对于霉菌的初步鉴别很有价值，已用于产分生孢子型霉菌的传统分群。分生孢子种类很多，有些无分隔，有些有一个或多个分隔。自然界中有些真菌可同时形成无隔和有隔 2 种类型的分生孢子。例如，镰刀菌属，体积大且有多分隔的分生孢子称之为大分生孢子，而体积小、有分隔或者无隔的分生孢子称之为小分生孢子。

分生孢子的形状也各不相同，有些大分生孢子又长又窄，如镰刀菌属某些种的孢子。分生孢子可能是由已存在的一个或者几个真菌细胞转化而成(菌丝型-关节孢子型)，也可能涉及新细胞壁的形成或在细胞壁上以吹泡式产生(芽殖)。分生孢子形成常发生于产孢细胞的特定部位。若产孢的部位固定且可产生多个分生孢子，此时产孢位置是稳定或确定的。若分生孢子在产孢细胞上新的部位形成，这时产孢位置是不固定或不确定的。新的产孢位置可在伸长(进化)或缩短(退化)的轴上。根据霉菌种类的不同，产孢细胞可产生一个或多个分生孢子。合轴式产孢是指在一个长轴的连续位置上分别形成单生的分生孢子的过程。瓶梗和环痕梗都是可以特异性的产孢细胞产生分生孢子。分生孢子持续产生后或呈链状，或呈头状簇生，最新产生的孢子在孢子链最底层(向基式)。瓶梗和环痕梗有时很难区分，但是环痕梗在形成

孢子时会变细长，有时甚至变窄，同时也会留下很多细微的芽痕。在油镜下观察到上述特征对鉴别十分重要。全芽生孢子，细胞壁内外层均参与孢子的发生，常呈向顶性链状排列，新生的孢子位于孢子链的最顶端。区分链的向顶式或向基式，可比较链顶部或基部分生孢子的体积和孢壁形态。新产生的分生孢子体积较小，染色时着色浅，粗糙型分生孢子的细胞壁饰纹也不同。有的产孢细胞在膨大的细胞表面能同时形成多个孢子，当分生孢子成熟时，经双隔裂解（裂解分裂）或破坏支持细胞（破生分裂）而脱落。分生孢子成熟释放还可以通过折断产孢细胞的细胞壁薄壁区，或者溶解支持细胞的途径。溶解分裂方式通常多发于皮肤及其相关真菌。

不同阶段真菌孢子的存在给鉴定带来了困难。当需要评估不同类型的孢子是否是某一真菌不同阶段的产物时，或者是否已经被其他真菌污染时，需要进行认真仔细的检查、甚至有时需要对单个孢子或菌丝顶端进行次代培养。产生多种分生孢子形态[即：共无性型（*synanomorphs*）]或具有有性期孢子和分生孢子的霉菌称为多形性真菌。该类真菌既有酵母型也有类酵母样，同时也可以形成多种复杂的载孢体结构，如分生孢子座（位于致密的菌丝或者菌丝体上的分生孢子梗）、分生孢子梗（孢子梗聚集而成）和分生孢子器（圆形或椭圆形的子实体，内可生成产孢细胞）。体外培养时，真菌共无性型的产生可能会受培养基的影响，同时也会因多次传代培养而丢失。

透明真菌引起人类和其他动物条件性感染的报道越来越多，本章无法一一详述。某些报道在鉴定真菌时仅仅鉴定到属的水平，另一些报道只提供了真菌菌名，但没有提供菌落和显微镜下的重要特征。一直以来困扰大家的问题是：当这些报道中的真菌未被充分描述和阐明，同时这些真菌菌株也未被恰当地保存下来时，这些研究的可靠性是无法验证的。本章介绍了一些医学上重要真菌的典型菌落和镜下特征，其中镰刀菌属部分内容参见表 123-2，其他条件致病性透明真菌的内容参见表 123-3。此外，有关这些真菌的详细内容请参考本文后附文献和指南[15,26-36]。在过去的十年里，通过使用多位点序列分型技术（MLST）人们发现真菌新菌种的速度太快，在临床上重要的镰刀菌属中，就有很多新的种类至今尚未阐明[37]。目前，有个网站可提供镰刀菌属的鉴定信息：Fusarium-ID（http://isolate.fusariumdb.org/index.php）[38]和 FusariumMLST 数据库（http://www.cbs.knaw.nl/fusarium/）[37]。这些网站通过使用翻译延伸因子（1α）部分编码基因或者其他位点基因序列在 BLASTn 比对查询，从而得到菌种分型信息。

二、临床意义

透明真菌引起的疾病种类广泛，主要取决于患者的局部和全身免疫状态及生理状态，有无临床症状。在大多数情况下，真菌繁殖体可能是通过肺部或者破损的皮肤进入人体。此外，还可通过污染的手术器械、人工晶体、假肢装置或其他一些受污染的医疗材料和外科手术及常规医疗过程中使用的液体物质进入人体。当患者患有严重的消耗性疾病或者接受免疫抑制治疗时，其抵抗力下降，易发生侵袭性肺部或鼻窦感染。但在某些情况下，真菌的感染可能扩散到周围组织或播散至全身各器官。除了见于播散性镰刀菌感染的患者外，真菌性菌血症较少见。非侵袭性真菌感染可同时发生在免疫力低下和健全的人群中。在这些病例中，真菌定植于原先存在的肺部空洞，如扩张的支气管、结核性空洞或肺囊肿。免疫功能正常的人群感染时临床症状还包括慢性鼻窦炎、甲癣、皮下脓肿、角膜炎、真菌病和过敏症状；另外，特应性患者可发生肺真菌病和鼻窦炎。

尽管大多数腐生菌和植物病原真菌不会引起人类和其他动物的感染，同时，它们也很少被认为是易感人群发生条件性感染的危险因素，但那些能在接近人体正常体温情况下可以生长的真菌具有潜在的致病能力。近年来新的确诊感染的报道发现越来越多的真菌可以侵入人体组织；此外，某些分离到的特定真菌也常具有致病潜力。仍然需要确定的证据来证明是腐生霉菌引起的感染。真菌病原学的实验室确证包括以下几点：① 标本中检出的菌丝形态与分离到的霉菌形态一致；② 分离出多个真菌菌落，或在多个标本中连续检出相同的真菌；③ 准确鉴定分离到的真菌；④ 确定真菌在人体正常体温（或其附近温度）的生长能力。应指出的是，尽管某些菌种在 35 ℃ 不生长，仍会引起免疫功能低下患者的系统性感染[39]；同

表 123-2　临床重要的镰刀菌属关键的表型特征[a]

复合体	菌落形态	特征				
		分生孢子座[b]	分生孢子	大分生孢子[c]	小分生孢子	厚壁孢子
FSSC						
茄病镰刀菌(FSSC 5)	白色至奶油色；背面通常无色；生长迅速	存在分生孢子座时呈白色至乳白色	长，单瓶梗从气生菌丝侧边伸出，多数具相当明显的羽状突起	中等弯曲，具短、钝的顶端和不明显的有花梗的基底细胞，多数 3～5 隔	丰富，卵圆形，椭圆形，肾形和梭形，0～1 隔	有，单一，成对；末端、中间或粗糙壁
枯萎镰刀菌（FSSC 1）*F. keratoplasticum*（FSSC 2）和一些未命名的菌种(图 123-1a)[d]	大部分呈奶油色，偶见淡蓝绿色，淡红色或淡紫色；絮状；快速生长	融合的黏分生孢子团呈奶油色	长，单瓶梗	多分隔；丰富的；粗壮的；厚壁；背面和腹侧面几乎是平行的	丰富的；大部分 0～1 隔；假头呈椭圆形到肾形	有，单一，成对
镰状镰刀菌(FSSC 3+4，原名：镰状枝顶孢霉)	奶油色到淡褐色，光滑到柔软；慢生长；在 SDA[e] 背面呈淡紫色	PDA 上少见	长，单瓶梗	极少产孢；多数无足细胞	1～3 个细胞	有，通常呈淡褐色
地衣生镰刀菌(原名：地衣生柱孢菌)	最初白色，随后浅黄到浅棕色，絮状，快生长	极少见	长，单瓶梗	直，多分隔，顶端圆形，截平基底细胞	无	短链和簇状，棕色，粗糙
F. neocosmosporiellum（原名侵管新赤壳)[f]	扁平，薄，近透明，产生橙色至浅褐色子囊壳时变成点状	无	长，单瓶梗	PDA 无	与枯萎镰刀菌相似	同枯萎镰刀菌
FOSC						
尖孢镰刀菌(图 123-1b)[g]	白色至淡紫色，浅橙色，背面淡紫色，絮状，快生长	橙色，裂出	短，单瓶梗	多分隔；轻微镰刀形，薄壁，纤细	大多无隔，椭圆形至肾形；只出现在假头上	有，丰富，单个或成对
FFSC						
轮生镰刀菌（原名：串珠镰刀菌）(图 123-1c)	白色至淡紫色，背面淡紫色，絮状，快生长	通常 PDA 上无，CLA 上黄褐色至橙色	中长，单瓶梗	多分隔，几乎是直的	0～1 隔，椭圆形至棒状，短截，出现在假头和链	无
F. thapsinum	形态上与轮生镰刀菌无区别，除了在 PDA 上产生黄色色素(并不是所有菌株都产生)	同轮生镰刀菌	同轮生镰刀菌	同轮生镰刀菌	同轮生镰刀菌	同轮生镰刀菌
芜菁状镰刀菌	白色至淡紫色，背面淡紫色	通常 PDA 上无，CLA 上黄褐色	中长，单瓶梗	多分隔；镰刀形几乎笔直	0～1 隔，卵圆形、梨(梨形)至芜菁状(甜菜状)假头，短链	少，短链或簇状
层生镰刀菌(图 123-1d)	白色至淡紫色，背面淡紫色；絮状；快生长	PDA 上可能无，CLA 上黄褐色	单瓶梗和多瓶梗	多分隔；镰刀形几乎笔直	椭圆形至梨形；截平；见于假头	无

（续 表）

复合体	菌落形态	特征				
		分生孢子座[b]	分生孢子	大分生孢子[c]	小分生孢子	厚壁孢子
F. nygamai	白色至淡紫色，背面淡紫色；絮状；快生长；中心可见紫罗兰色的孢子团	CLA 上橙色	单瓶梗和多瓶梗；但是多瓶梗的产生是可变的	多分隔；镰刀形几乎笔直；薄壁	椭圆形至棒状；多数假头无隔，短链状（相当于 20 个分生孢子的长度）	少至丰富；单一，链状，成串；光滑或粗糙，透明至黄色
FCSC						
厚垣镰刀菌	白色到粉色到深红色，厚垣孢子的产生使中心呈褐色；絮状；快生长	PDA 罕见；CLA 上黄褐色至橙色	短的单瓶梗和短的多瓶梗，通常有 3 个开口	罕见，除了在分生孢子座上外，	0～2 隔，梭形，顶端尖；某些菌株的小分生孢子在 PDA 上缓慢形成	丰富，棕色，粗糙，链状，成串
FDSC						
双胞镰刀菌（图 123-1e）	黏液状，由于分子孢子团而呈酵母样，气生菌丝稀疏；橙红色至淡橙色，背面一样或浅黄色；慢生长	橙色，在 CLA 上生长良好	单瓶梗；分生孢子出现在琼脂表面，从侧边瓶梗的钩产生	丰富，0～1 隔，有中间隔；弧形	椭圆形至卵形至弧形；大部分是单细胞	衍生自大分生孢子，菌丝的厚垣孢子罕见或无
胶胞镰刀菌（图 123-1f）	与 *F. dimerum* 相似，但背面可能会有红褐色色素团	形态同双胞镰刀菌	形态同双胞镰刀菌	可有 2 隔；如果是 1 隔时，隔偏离中心	形态同双胞镰刀菌	形态同双胞镰刀菌
FIESC						
镰刀菌属[h]	浅黄至浅棕色，背面橙红色；絮状；快生长	橙色，一些菌株在 CLA 上可产生	单瓶梗和多瓶梗	气生菌丝所产生的大分生孢子基本都是笔直的；黏分生孢子团[i]或分生孢子座产生的大分生孢子是弯曲的	0 隔；稀疏或无	稀疏，加在中间，单细胞或链状

注：[a]在马铃薯葡萄糖琼脂(PDA)25 ℃培养 4 天，除非另有说明。表中特征的更详细的描述见文中参考文献。列表不包括详细特征。[b]菌丝，分生孢子梗和大分生孢子形成的垫；CLA. 康乃馨叶琼脂。[c]所有菌属在 CLA 上的分生孢子座产生的大分生孢子是最典型的；PDA 上的气生菌丝也产生大分生孢子，通常较小。[d]在 FSSC 中，至少有 20 个菌种会导致人类和其他动物的真菌感染。FSSC 成员所致的感染大多是由枯萎镰刀菌(FSSC 1)，*F. keratoplasticum*(FSSC 2)和枯萎镰刀菌(FSSC 3+4)引起[12,49]。[e] SDA：沙保弱琼脂培养基。[f]有小分生孢子、自体能育、同宗配合的镰刀菌属细菌培养时常产生子囊壳子实体。子囊壳壁是赤豆组织类型，子囊是圆柱形，8 个孢子[(30～100)μm ×(11～15)μm]；子囊孢子单细胞，厚壁，粗糙，黄色至褐色，球形至椭圆形[(10～15)μm×(7～12)μm]。[g] FOSC 系统发育多样化，至少包括 26 个与真菌病相关的两位点序列类型[53]，包括广泛流行的 ST33 克隆，分离自医院或其他管道系统[14,47]。[h] FIESC 中有 20 个菌种能引起人类和其他动物的霉菌感染[13]，只有 *F. equiseti*(FIESC 14)和 *F. lacertarum*(FIESC 4)是二分裂生殖。尽管变红镰刀菌，*F. pallidoroseum* 和半裸镰刀菌普遍归属于 FIESC，但在明确它们代表哪个菌种之前，这些命名不应该被使用。[i]扁平的大分生孢子簇具有油脂样的外观

表 123-3　一些重要透明霉菌的主要表型特征

组和属名	主要特点[a]	病原体	注释
同宗配合			
子囊菌纲			
无毛毛壳菌属[b]	菌落生长迅速，白色至淡黄色，伴有粉红色色素扩散(图 123-1g)，分生孢子在小瓶梗形成。浅棕色的子囊壳外有刚毛。子囊孢子呈棕色，光滑，纺锤体形	膨胀无毛毛壳菌[b]	42 ℃生长，嗜神经组织，比照毛壳菌属。延长培养通常可以促进子囊壳的产生
Amesia[b]	菌落因子囊壳和大量子囊孢子而变黑，7 d 内成熟。刚毛弯曲。子囊孢子纺锤形。47 ℃可生长；嗜神经	*A. atrobrunnea*[b]	原名：黑褐色毛壳菌
隐囊菌属[b]	菌落生长速度一般，黄白色，颗粒状，耐放线菌酮。闭囊壳球形，内含粗糙的子囊孢子，与金孢子菌属无性型有关联，它含有末端单细胞的固定孢子和交替的关节孢子	黄褐隐囊菌[b]	与金孢子菌属和皮肤癣菌对比。延长培养时间通常可以促进闭囊壳的产生
头鞘菌属[b]	菌落生长速度一般，绒毛状至绵状，橙灰色，背面淡棕色。这一子囊菌是同宗配合的，形成黑色的表面有纤毛的闭囊壳及小的棕色肾型有小凹的子囊孢子(图 123-2d)。与单胞瓶霉样无性型有关(图 123-2d)	陷阱头鞘菌[b]	紫外线和延长孵育时间能增加闭囊壳的产量
毛壳菌属[b]	菌落生长迅速，黄绿色至灰色，无无性型，分生孢子在瓶梗处形成。囊实体子囊壳外有盘绕的、直的、棕色分支，或难以认清的刚毛。子囊孢子柠檬状，棕色，外表光滑	球毛壳菌[b]，玻璃毛壳菌[b]	玻璃毛壳菌在 42 ℃生长且嗜神经组织。延长培养时间可以促进子囊壳的产生
小裸囊壳菌属[b]	菌落呈黄白色，可变成亮黄色、黄绿色、橙色(图 123-1h 和 123-2a)。子囊孢子裸露、成团，外表光滑，呈淡黄色。无无性型。透明孢小裸囊壳菌的孢子呈淡黄色扁圆形(图 123-2b)，丹喀小裸囊菌红褐色，边上有增厚的极带	透明孢小裸囊壳菌[b]，丹喀小裸囊菌[b]	透明孢小裸囊壳菌也叫 *Narasimhella yalinospora*，可能造成检测皮炎芽生菌的 GenProbe-DNA 探针产生假阳性结果
小囊菌属[b]	菌落生长速度一般，透明或棕灰色至黑色；子囊壳伴有颈部(图 123-2c)，含有淡黄色至微红色挤在纤毛里的子囊孢子。它们和透明或单倍体帚霉属无性型有关	卷毛小囊菌[b]，灰白小囊菌[b]，三角孢小囊菌[b]，麦格尼小囊菌[b]，*M. Gracilis*[b]	列举的前三种菌的子囊孢子形状分别是黑色心形、橙色截面形和三角形。也可参见帚霉属
帚霉属[b]	菌落白色，浅黄色(*S. Asperula* 灰褐色)。产孢细胞的环痕梗形成于分枝的分生孢子梗上，有 1 或 2 个分枝水平。分生孢子球状或椭圆形、成链。短帚霉产生浅黄色或棕褐色颗粒菌落，分生孢子厚壁光滑至粗糙，在基部截平，顶端圆形或尖状(图 123-4f)。念珠帚霉产生白色菌落和光滑的分生孢子。*Scopulariopsis cordiae* 产生心形子囊孢子	短帚菌，念珠帚霉，*S. asperula*，*S. cordiae*[b]	另请参阅小囊菌属
嗜热子囊菌属[b]	菌落呈橙黄色至橙红色，绒毛状或颗粒状，耐热，能在 50 ℃ 生长；可产生闭囊壳；子囊孢子淡黄色，椭圆、壁厚而且表面粗糙。无性型是拟青霉状的。*T. taitungiacus* 的孢子最初是长方形的，然后变成椭圆形甚至近球状	甲壳嗜热子囊菌[b]，*T. taitungiacus*[b]	*T. taitungiacus* 不能在 20 ℃ 生长，有不规则有疣的子囊孢子，甲壳嗜热子囊菌的子囊孢子具有小刺
丝状菌			
担子菌纲			
鬼伞属(*Coprinellus*，*Coprinopsis*)	菌落生长迅速，白色，琥珀色至棕褐色，羊毛状，放线菌酮敏感，耐苯菌灵。分生孢子梗短，有许多短小分支。关节孢子裂解，壁薄，单细胞，常黏附周围的分生孢子。有时可见菌核	家园鬼伞菌(*Coprinellus domesticus*) 灰盖鬼伞菌(*Coprinopsis cinereal*)	与卡尔那爪甲白癣菌不同的是对放线菌酮敏感且生长速度快 以前以轮状小链黏孢(*Hormographiella verticillate*)和曲霉小链黏孢(*H. aspergillata*)的名称报道

（续 表）

组和属名	主要特点[a]	病原体	注释
锐孔菌属	菌落在 35 ℃生长速度中等，但在 25 ℃生长迅速，白色绒毛状，无分生孢子，需通过检测基因序列进行鉴定	树皮锐孔菌	引起被子植物和裸子植物白腐病的真菌
原毛平革菌属	菌落快速生长，白色至浅黄色至米黄色，绒毛状。分生孢子梗具大量分支，每个分支终止于分生孢子。分生孢子椭圆形，截平，壁厚，光滑。大（20～60 μm）的球形厚壁孢子和关节孢子也存在	黄孢原毛平革菌	痰中可见类似于小伊蒙菌的球形厚垣孢子。既往名称：白粉侧袍霉属
Quambalaria	菌落生长速度中等，对放线菌酮敏感，呈白色至淡紫色，常见红色色素扩散，只有一个分生孢子梗，在顶部或者旁边生成合轴孢子。初代孢子含有 1～3 个二代孢子	*Q. cyanescens*	与 *Fugomyces cyanescens*、变蓝孢子丝菌和蓝色柱孢霉相同
裂褶菌属	菌落生长快速，羊毛状或绵状，对放线菌酮敏感，在 37 ℃ 生长好，一般不育，菌丝上有类似曲霉菌的锁状联合和针状结构，但可能两者都没有（图 123-2g）。培养 3～6 周后，菌株呈扇形，伞菌（图 123-2h）	*S. radiatum* 普通裂褶菌	临床表现类似曲霉病，组织病理上呈无锁状联合分离株（图 123-2f）
热带孔菌属（*Tropicoporus*）	快速生长的毛状黄橙色菌落；对放线菌酮和苯菌灵耐药。刚毛菌丝壁厚，菌丝肿胀；无分生孢子（图 123-3a）。鉴定应该经测序确认	*T. tropicalis*	与热带仙孔菌，热带针层孔菌（*Phellinus tropicalis*）相同。可破坏木头的担子菌
丝孢纲			
枝顶孢属	菌株生长缓慢（通常 10 d<3 cm），常呈白色，棉状，束状（有穗），光滑或湿润，呈粉红色或浅橙色。产孢细胞单独存在，细长（2 μm 宽），通常无分支，锥（针）状瓶梗。分生孢子单细胞，直的或弯的，生长呈黏糊状	产菌核枝顶孢 埃及枝顶孢 牵连枝顶孢 雷氏枝顶孢 波期枝顶孢 纺锤型枝顶孢 枝顶孢属	和镰刀菌不同的是，其生长速度慢，菌丝较窄（大多宽<2 μm），更细长的针样的瓶梗。与子囊壳属和单孢瓶霉、*Brunneomyces*、*Chordomyces* 比较
顶端瓶霉属	菌落生长快速，白色，中心呈黑色、灰褐色。分生孢子梗棕色，长，类似针状，带有小刺。产孢细胞瓶状，在分生孢子梗尖端或营养菌丝上产生孢子。分生孢子链状，单细胞，柠檬形，光滑或粗糙，可见明显不同的螺旋带	梭孢顶端瓶霉 光滑顶端瓶霉（*A. levis*）	在 40 ℃ 生长，潜在的嗜神经组织菌种，与拟青霉属、多育节荚孢霉（多育赛多孢）比较
爪甲白癣菌	菌落生长缓慢，37 ℃ 生长快速。起初呈白色，类似酵母菌，但后来产生菌丝且呈浅黄色，背面黄色。耐放线菌酮。分生孢子梗树枝状，有侧枝。关节孢子由分支分裂或未分化的菌丝形成	卡尔那爪甲白癣菌 *A. curvata* *A. chlamydospora* *A. globosa*	与甲霉、柱顶孢属、*Coprinellus*、*Coprinopsis* 和新柱顶孢属相比
Brunneomyces	菌落中央灰色，周边黄白色。通常存在 Polyphialides。分生孢子长、链状。随着培养时间的延长菌丝变成深褐色，疣状，壁厚	*B. hominis*	形态上类似于枝顶孢属。*Brunneomyces hominis* 是该属唯一在 35 ℃下生长
白僵菌属	菌落生长缓慢至中等速度，黄白色。产孢细胞单独存在（在轮生体或分生孢子座中），基部膨胀，在顶部 Z 字形（膝状）串珠状增殖。分生孢子单细胞，近球形	巴西安白僵菌	与 *Parengyodontium album* 和孢子丝菌属比较。巴西安白僵菌可用于生物防治昆虫
Chordomyces	菌落白色至奶油色，局限生长，在 PDA 上堆积生长。嗜碱性条件。*C. albus* 不同于 *C. antarcticus*，它在培养基中不产生联丝体	*C. albus* *C. antarcticus*	形态上与枝顶孢属相似；黏液头上的分生孢子
金孢子菌属	菌落生长缓慢至中等速度，黄白色。分生孢子单细胞，光滑至粗糙。分生孢子无柄或在不膨胀的梗的末端或两边生成（图 123-3c）。有时可见关节孢子（见隐囊菌属和伊蒙菌属）	*C. zonatum*	未命名种的感染很难评估，因为很难充分证实分离株就是病因

（续　表）

组和属名	主要特点[a]	病原体	注释
子囊壳属	菌落呈白色至浅橙色，湿润，束状（穗状）或棕褐色，有时变深成黑色。产孢细胞 adelophialides（短，瓶梗粗短，无基底隔膜），和锥形瓶梗一样。易变子囊壳菌产棕色厚壁孢子，霍夫曼子囊壳菌不产	霍夫曼子囊壳菌， 易变子囊壳菌	与枝顶孢属的区别是 adelophialides。菌丝通常是透明的，见第 127 章
柱孢属	菌落生长迅速，针状或棉状，黄白色、黄褐色、橙色或紫色，有时可见色素扩散。产孢细胞是有单个开口的锥形瓶梗。它们在分支结构或分生孢子座（分生孢子挤在紧密的菌丝团）单独存在。大分生孢子直的或圆头略弯曲，多细胞。小分生孢子与大分生孢子没有明显的区别，有时可见厚壁孢子	毁灭柱孢霉 蓝色柱孢霉	与镰刀菌不同的是大分生孢子，顶端细胞圆形，无足细胞
绿僵菌属	菌落生长速度中等，橄榄绿或浅黄色。产孢细胞呈圆柱状瓶梗，与在分生孢子座上形成的轮生或不规则分支的分生孢子梗有关。分生孢子圆柱状，光滑，黄绿色，贴壁生成。可见不规则形的附着胞	绿僵菌	昆虫生物控制剂
毁丝霉属	嗜热毁丝霉属具有嗜温性而不是嗜热性	嗜热毁丝菌	与金孢子菌不同的是有隆起的梗。成熟时分生孢子光滑
多齿菌属	菌落生长速度中等，黄白色，常有环带，粉状。分生孢子在细小梗末端生成，与丰富的菌丝垂直	嗜角朊多齿菌	与金孢子菌属不同的是与梗垂直产孢子
Nannizziopsis	菌落生长缓慢至中等快速，呈黄白色。分生孢子 1 孔，光滑至粗糙，无柄孢子在不膨胀茎的末端或侧面。有时出现关节孢子	*N. arthrosporioides* *N. barbata* *N. chlamydospora* *N. crocodili* *N. dermatitidis* *N. draconii* *N. guarroi* *N. hominis* *N. infrequens* *N. pluriseptata* *N. vriesii*	宿主如下： 水龙（Water dragon） 沿海胡子龙 （Coastal bearded dragon） 内陆胡子龙 （Inland bearded dragon） 盐水鳄鱼 变色龙，壁虎 内陆胡子龙 绿鬣蜥，内陆胡子龙，蜥蜴，蛇， 人类 人类 石龙子（Skink lizard） 蜥蜴
甲霉	菌落生长受限，隆起，黄白至灰白色，耐环己酰亚胺（图 123-3f）。分生孢子 1～2 个细胞，圆柱状或串珠状膨大的关节孢子，其通过裂解或溶解薄壁细胞脱落。常见棕色多节刚毛（图 123-3g）	加拿大甲霉	与新双间柱顶孢（第 127 章）和鬼伞菌不同的是，其链状附着，生长缓慢且耐放线菌酮
Ophidiomyces	菌落生长缓慢至中等快速，呈黄白色。分生孢子 1 孔，光滑至粗糙，无柄孢子在不膨胀茎的末端或侧面。有时出现关节孢子	*O. ophiodiicola*	圈养和野生蛇的新病原
拟青霉属	拟青霉属包括耐热宛氏拟青霉、无性型丝衣霉和热子囊菌，菌落生长速度快，土黄色、浅黄色或橙色（图 123-3h）。产孢细胞是轮生分支的分生孢子梗上形成的瓶梗。分生孢子单细胞，链状生成	宛氏拟青霉， *P. formosus*， 爪哇拟青霉， 玫瑰色拟青霉	嗜热子囊菌属也会产生类似拟青霉的变形体

（续 表）

组和属名	主要特点[a]	病原体	注释
Paranannizziopsis	菌落生长缓慢至中等快速，淡黄白色。分生孢子1孔，光滑至粗糙，无柄孢子在不膨胀茎的末端或侧面。有时出现关节孢子	*P. australiensis* *P. californiensis* *P. crustacea* *P. longispora*	宿主如下： Northern tuatara， 沿海须龙(coastal bearded)， 水曲柳蛇(aquatic file snake) 吻突蟒蛇(Tentacled snake) 吻突蟒蛇 吻突蟒蛇
Parengyodontium	菌落生长缓慢至中等快速，淡黄白色。产孢细胞单生或轮生，基部肿胀，尖端逐渐变细，并呈锯齿形(呈曲折状)。分生孢子1孔，近球形	*P. album*	与白僵菌比较。以前称为白色侧齿霉菌
单孢瓶霉属	菌落生长缓慢，白色至浅灰色。产孢细胞短枝状(无基部隔膜的粗短瓶梗)，瓶梗锥形。倒卵单胞瓶霉产绿色色素	倒卵单胞瓶霉， 暗灰色单胞瓶霉， 胀单胞瓶霉， 球形单孢瓶霉	与枝顶孢属和子囊壳属相比。也可见第127章
Phialemoniopsis	菌落生长缓慢，黄白至浅灰色(图123-4c)。产孢细胞短枝状，瓶梗锥形	*P. curvata*， *P. pluriloculosa*， *P. cornearis*， *P. ocularis*	与单胞瓶霉属和子囊壳属相比
紫孢菌属	比拟青霉菌属生长慢，25～33℃最快生长，分生孢子淡紫色(图123-4a)，无厚壁孢子(图123-4b)	淡紫紫孢菌	与拟青霉菌属和 *Rasamsonia* 相比
Rasamsonia	菌落生长速度中等，35℃生长加快，奶白色至浅黄色。菌柄和梗基粗糙。分生孢子楔形至椭圆形，和青霉菌或拟青霉菌一样，产自缺乏细小瓶颈的粗壁瓶梗(图123-3d)	*R. argillacea*	同 *Penicillium argillaceum*/*Geosmithia argillacea* 与甲壳嗜热子囊菌的孢子相比较
帚枝霉属	帚枝霉菌系统演化上与支顶孢属明显不同。少数菌种在SDA上呈土棕色。产孢细胞是短枝状或细长瓶梗	*S. kiliense*， *S. strictum*， *S. bacillisporum*	与枝顶孢属、*Chordomyces* 相比
Thermothelomyces	菌落快速生长，嗜热(最高50℃)；肉桂棕色。1～3个分生孢子形成小细齿状，在侧面或末端短而肿(图123-3e)。分生孢子最初光滑和透明；成熟时呈褐色和粗糙	*T. thermophila*	茎肿胀与金孢子菌不同。以前是嗜热毁丝霉
木霉属	菌落生长，羊毛状或棉状，白色变黄绿色最后至暗绿色，有时有黄色素扩散(图123-4g)。产孢细胞为瓶形或圆柱形的瓶梗，单发或轮生，孢子绿色，光滑，椭圆形到近球形(图123-4h)	长梗木霉 拮抗木霉 哈茨木霉	长梗木霉和哈茨木霉进化枝都包含多个物种
腔孢纲			
刺盘孢属	菌落生长迅速，羊毛状，黄褐色至棕灰色，有时呈绿色，有时呈淡紫色，伴黄色分生孢子团。常可见棕色附着胞，无性繁殖体(子实体)acervular，瓶梗产孢。分生孢子透明无隔膜，直的变弯，也可在气生菌丝里形成。可见刚毛和麦角菌硬粒	胶孢刺盘孢 球形刺盘孢 暗色刺盘孢 粗柄刺盘孢	菌落在PCA上可能呈黑色，但产孢能力更好。暗色刺盘孢和镰刀菌相比较。正在解决隐含的物种
茎点霉属	菌落浅黄褐色至棕灰色，羊毛状，无性繁殖体即分生孢子器，通常黑色，单独或集群存在。小孔单发或多发，浸没或半浸没，大多壁薄，瓶梗产孢，分生孢子单细胞，小，透明，常有滴状斑点	文献中报道了几个物种，但大多数都没有很好的记载	种水平鉴定困难。已经进行了许多分类修订，并对于亲缘关系相近的类茎点霉属增加了新的属。参见参考文献[212]和[214]。其他腔孢纲属见第127章

注：[a]除非另有注释说明，一般在PDA上25℃培养4天。如需更加详细的表中所提到的形态特征，可参考本文列出的参考文献。该表不包含在内。[b]表中列出种在培养时产它们自己的有性世代(有性结构)

时也是皮肤或皮下真菌病的常见病因。从深部组织或体液标本中分离到的镰刀菌或其他透明真菌必须被视为潜在的侵袭性条件致病菌。在未对标本进行全面检测前任何分离出的真菌都不能被当作污染而放弃处理。质量控制措施保证分离用培养基未受污染,检视平板或斜面,以评价真菌菌落是否生长在标本接种区域,对于确定分离菌是否致病同样很重要。临床与实验室之间的密切沟通也非常关键,特别是在长期进行免疫抑制治疗患者中检出不常见的条件致病菌。

三、标本的采集、运输和储存

须仔细采集疑似真菌病患者的临床标本,并尽快送至实验室进行检测,具体步骤参见本书的第117章。由于临床症状不同,真菌检验时需采集不同感染部位的标本。活检组织标本、气管抽吸物、清晨采集的痰标本及感染的指(趾)甲都可用于分离和鉴定透明霉菌。一般来说不推荐使用从黏膜和皮肤破损处取下的拭子。尽管当两份不同标本培养出相同真菌时,判断其为致病菌的可信度增加,但是组织活检的组织学检查和培养更为有用。血培养对于能形成分生孢子链的侵袭性透明真菌的检测意义不大,如曲霉菌属[40],但对镰刀菌和其他产生大量酵母样小分生孢子的菌种的检测意义可靠[41]。为获得最佳的分离效果,标本需接种于不同类型的培养基上,并置于28~30 ℃培养。条件致病性霉菌对放线菌酮的敏感性不同,因此若培养基中含有这种物质时应慎重使用。疑似菌株,尤其是少见的菌种应测试其在35~37 ℃的生长能力。有潜在嗜神经性的菌种也能在40 ℃或以上环境生长[42-43]。

四、镰刀菌属

(一)分类

镰刀菌属是一类全球性分布的土壤腐生菌,同时也是一种兼性的植物病原菌,能引起人和动物的感染及中毒[15,27,44-45]。该类真菌属于肉座菌目的丛赤壳科,其中有临床意义的种大多数是异宗配合型,无性生殖态仅见于体外培养时。在2013年1月1日放弃双命名法之前,镰刀菌有性期被分类为赤霉菌属、新赤壳属和其他菌属;但是这些分类应以镰刀菌无性期名字报告[20]。一些分子系统发育研究发现在形态学特征方面曾经被认为是独立亚种的镰刀菌其实可以归为一类复合种[7-8,14-17,38,46-47]。多位点发育分析研究发现大多数临床常见的重要镰刀菌都可归类于茄病镰刀菌复合种(*Fusarium solani* SC,FSSC)(图123-1a)。FSSC内有超过60个不同亚种,并可分为3个主要的进化枝,与人类关系密切的菌株属于第3分支[12,48]。第3进化枝又与四个主要的种水平遗传谱系相关,大多数人类分离株多归类于第1和第2遗传谱系[8,17,49]。随后,很多研究又在FSSC的第3进化枝中发现34种新的种属[12]。由于拉丁文双命名法不能应用于该复合体内的大多数物种,所以该物种和多位点单倍型是由一个特殊的使用阿拉伯数字和小写罗马字母的命名法来区分的。在FSSC中最重要的临床相关菌株是枯萎镰刀菌(FSSC 1)、*F. keratoplasticum*(FSSC 2)[50]、镰状镰刀菌(FSSC 3+4)、*F. solani sensu stricto*(FSSC 5)[51]、地衣生镰刀菌*F. lichenicola*(FSSC 16)、*F. neocosmosporiellum*(FSSC 8,原名:侵管新赤壳)[52]。目前,已知尖孢镰刀菌复合种(*Fusarium oxysporum* SC,FOSC)是一种植物枯萎病病原体,可以造成各种重要的农作物枯萎病[53];同时,它也是引起人类感染最常见的镰刀菌复合群之一(图123-1b)。FOSC系统发育分型也是多样化的[54]。有研究采用多位点序列分型(multilocus sequence typing,MLST)和扩增片段长度多态性(amplified fragment length polymorphism,AFLP)方法分析了超过100株分离自医院纤维支气管镜、环境、水源及患者标本,结果发现了一个广泛流行的克隆谱系,本研究中超过70%的菌株都是这个谱系[14]。这些研究进一步证实了医院配水系统是一个潜在的院内感染源[55-56]。通过多位点基因分型技术,一些医学上重要的镰刀菌种属已被归类至物种丰富的藤仓镰刀菌单纯复合种(*F. fujikuroi* SC,FFSC)中[7,9-10]。这些镰刀菌属包括轮生镰刀菌(图123-1c),层生镰刀菌(图123-1d),芜菁状镰刀菌和*Fusarium nygamai*。另一组形态和进化不同的镰刀菌包括那些以前称为半裸镰刀菌或变红镰刀菌的菌属,但是这些菌属现在归类至变红镰刀菌-木贼镰刀菌复合种(*F. incarnatum*-*F. equiseti* SC,FIESC)[11]。基于多

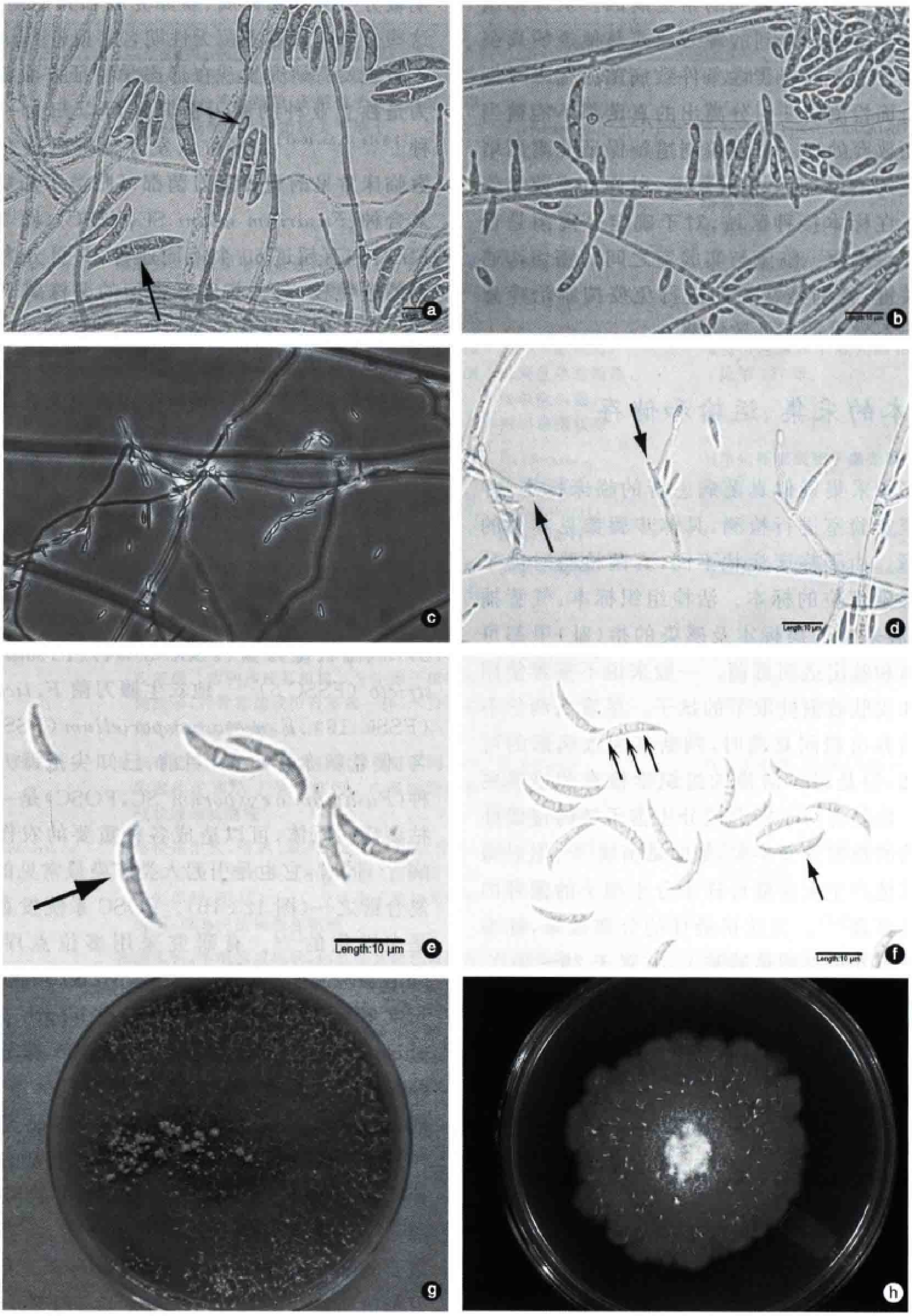


图 123-1 a. FSSC 成员。生长在长单瓶梗的小型分生孢子(细箭头)。生长于气生菌丝的大型分生孢子(粗箭头)。b. FOSC 成员，短单瓶梗上的小分生孢子。还有一些大分生孢子也在图中展示。c. FFSC 成员中轮生镰刀菌(原名串珠镰刀菌)的链状小分生孢子。d. FFSC 的成员层生镰刀菌。箭头所示为多瓶梗，有一个以上开口，不以隔来划定界限，截取的分生孢子成链状，假头也在图中呈现。e. FDSC 家族双胞镰刀菌的双细胞大分生孢子，隔位于中间。f. FDSC 的胶孢镰刀菌的双细胞大分生孢子的隔是偏离中心的(粗箭头)，细箭头所示为 3 个隔、4 个细胞的大分生孢子。g. 膨胀无毛毛壳菌在玉米粉琼脂培养基上生长 5 周，菌落形态表现为淡黄色的菌丝表面和粉红色色素。h. 参考文献[142]描述了透明孢小裸囊壳菌在马铃薯葡萄糖琼脂培养基中 30 ℃生长 15 天后的光滑和无核(无孢)菌落，见彩插

位点序列分析技术的研究发现 FCSC 至少包含 28 个种[13]，但拉丁双名法仅可应用于其中的 3 个（木贼镰刀菌＝FIESC 14，*F. lacertarum*＝FIESC 4 和 *F. scirpi*＝FIESC 9）。由于这个原因，针对这个复合体中的所有物种制定了特殊的非正式命名法。厚垣镰刀菌复合种（*F. chlamydosporum* SC，FCSC）在系统发育上也是多样的，并且基于多基因位点分型至少包括 4 个物种[13]。同样，双胞镰刀菌复合种（*Fusarium dimerum* SC，FDSC）（图 123-1e，f）当前包含 7 个已命名物种和 2 个未命名物种[57]。FDSC 中的镰刀菌种不同于上述的复合种，它们通常生长缓慢，气生菌丝体缺乏或稀疏生长，所以菌落可呈黏滑样（通常呈橙色）。

（二）病原体介绍

由分类学可知，大多数引起人和动物感染的镰刀菌属于 6 个复合种。根据目前对属的了解，这些复合物中最常见的物种如下：① FSSC，包括镰状镰刀菌、枯萎镰刀菌、*Fusarium keratoplasticum*、茄病镰刀菌（仅限于系统发育种 FSSC 5）。② FOSC，包括尖孢镰刀菌（系统发育不同，但目前未能解决种的限制）。③ FFSC，包括轮生镰刀菌、*Fusarium thapsinum*、层生镰刀菌。其他 3 个复合种中的镰刀菌很少作为真菌病的病原菌，包括 FIESC（菌种包括曾经因未命名而误报的藤仓镰刀菌、*Fusarium pallidoroseum* 或半裸镰刀菌）、FDSC（包括双胞镰刀菌和胶孢镰刀菌）和 FCSC（包括 *F. cf. chlamydosporum*）。见表 123-2。

（三）流行病学及传播

镰刀菌属产生的大量有毒次级代谢物可能与人类疾病有关，尤其是和食用被污染的粮食有关的疾病（第 129 章）。食物中毒性白细胞缺乏症主要是因食用了被拟分枝孢镰刀菌和梨孢镰刀菌污染的粮食所引起，与这些霉菌产生的单端孢霉菌毒素有关[58]。除了经口摄入霉菌毒素外，吸入霉菌毒素造成的对全身的影响也是由镰刀菌引起，尽管这些影响特征尚不明确[59]。在人类疾病中最常见的临床表现是镰刀菌分生孢子与宿主接触并发芽，随后组织被菌丝侵入。然而，大多数侵袭性感染中镰刀菌入侵人体的途径都是不清楚的。在某些情况下可能会通过黏膜摄取或进入[60-61]。播散性感染也可继发于甲癣，尤其与蜂窝织炎有关[62]。Anaissie 和 O'Donnell 等[14,55]研究发现医院供水系统也可能是免疫缺陷患者发生院内感染的感染源之一。但是镰刀菌感染最为常见的传播模式是吸入气生分生孢子[63]。

镰刀菌引起的侵袭性感染并不多见，但是在中性粒细胞缺乏的白血病患者、实体器官移植受体和骨髓移植受体中的感染发生率呈上升趋势[1,41,45,61,64-73]。异源性造血干细胞移植受体的镰刀菌病发生率不尽相同，其中 HLA 配型成功的患者中发生率为 4.21‰～5.00‰，而 HLA 不合者为 20.91‰[72]。在同种异体造血干细胞移植受者中发生镰刀菌感染存在 3 个高峰期：第一波是在移植前，第二波是移植后 62 天（中位数），第三波是移植 1 年以后。其准确生存率是 13%（中位数为 13 天），持续性中性粒细胞减少（危害比 5.43）和皮质醇激素的使用（危害比 2.18）是预后不良最重要的 2 个因素[69,72]。

（四）临床意义

镰刀菌属能引起健康人和免疫功能不全人群的感染。健康人群中通常在以下一些情况下引起的角膜炎后继发镰刀菌感染：角膜损失和穿透，以及配戴的软性隐形眼镜或其药水的污染[11,49,70,74-76]；此外，使用皮质类固醇滴眼液后造成局部免疫抑制也可引起感染[70]。2005—2006 年，在中国香港[76]，以及新加坡[75]和美国[49]部分地区，使用了润明水凝护理液（博士伦，罗彻斯特，纽约）的隐形眼镜配戴人群中暴发了镰刀菌感染所致的角膜炎，由此引发了对此类镰刀菌的大量研究，并且发现这类菌株在分类学上基本都属于临床重要的镰刀菌复合种。在免疫功能不全人群中引起的感染请参见表 123-1。不同进展阶段的皮肤病变[72,77]、真菌血症[78]、鼻脑受累征、肺炎、内源性眼内炎[79-80]或合并发生这些病变都是播散性镰刀菌病的常见临床症状[41,45,61,69-73,81-82]。与侵袭性曲霉病不同的是，在镰刀菌播散性感染的患者血液中镰刀菌的分离率接近 60%[41,71]。大部分 FSSC 复合种的成员是最经常提到的感染病原体，其中最常见的感染是角膜炎[27,83]。尽管 FSSC 内有多个种被报道为茄病镰刀菌，但该名称仅适用于系统发育物种 FSSC 5[51]。Mayayo 等[84]认为 FSSC 复合种的毒力最强，并且致病物质可能是其产生的环孢菌素[85]。此外，研究发现 FOSC 复合种[14]与 FFSC 复合种中的轮生镰刀

菌[86]感染谱相似,可能将来成为下一个常见感染的病原体。在意大利,轮生镰刀菌是最常见的导致深部感染的分离菌种[87]。由于串珠镰刀菌的名称曾用于轮生镰刀菌和 FFSC 中的其他某些物种,因此在过去的临床病例报告中,以原名称报告的病原体鉴定只能通过培养物收集的 DNA 分型进行验证。由于镰刀菌属命名的更新,现在很难明确以往病例中致病菌株的具体分类信息。参考文献[27、37、57、87-89]已提供给大家一个更全面的镰刀菌属与人和动物疾病相关性的信息。

(五)标本的采集、运输和储存

标本收集、运输和储存的方法详见第 117 章。和侵袭性曲霉菌感染一样,侵袭性镰刀病的感染也很难诊断,它通常需要结合临床症状、培养结果和影像学结果进行综合分析。但与曲霉菌不同的是,镰刀菌常可在免疫功能低下或免疫抑制患者的血液、指甲和皮肤破损处分离出[60,90]。从无菌部位检出镰刀菌或者显微镜检证实组织中发生侵袭性生长是诊断侵袭性镰刀菌病最为有力的证据。

(六)直接检查

1. 显微镜检查 组织标本直接镜检时,镰刀菌的菌丝大小(宽度为 3~6 mm)、分隔、分枝类型和嗜血管特性方面都与曲霉菌、青霉菌和丝孢菌属类似。菌丝宽度不规则,有时可见塌陷区。此外,直接镜检还可以观察到两种不同的菌丝分支,一种为二歧分枝(如 45°分枝),此常见于侵袭性曲霉菌;另一种为直角分枝[91-92]。在血管腔或暴露的组织中可以找到小分生孢子、大分生孢子(罕见)、出芽细胞和瓶梗[92]。免疫组化法有助于区分一些透明霉菌引起的感染,但其缺陷是存在交叉反应,另外血清学实验并不常用[93]。感染的确诊需要分离和鉴定出镰刀菌,同时在感染组织中检出真菌。

2. 抗原检测 目前没有商品化试剂盒可用于在感染人群中检测镰刀菌属和种特异性抗原。针对 FSSC 复合种的多克隆荧光抗体检测的诊断价值,已在侵袭性镰刀菌病患者的组织切片标本检测中进行评估,结果发现与曲霉菌、淡紫紫孢菌和波氏假阿利什霉菌存在交叉污染[94]。

一项采用伯乐公司 Platelia™ 曲霉菌抗原检测试剂盒的研究显示,11 例播散性或深部镰刀菌感染的血液病患者中有 9 例血清半乳甘露聚糖抗原反复出现阳性,但是这些患者并未发生曲霉菌感染[95]。诸如尖孢镰刀菌、层生镰刀菌、镰状镰刀菌和轮生镰刀菌等镰刀菌属真菌可释放一种外抗原,在未稀释的情况下,曲霉菌半乳甘露聚糖抗原(GM 试验)检测时可出现阳性反应[95]。这表明镰刀菌属可产生与曲霉菌半乳甘露聚糖检测发生交叉反应的外抗原。用念珠菌抗原检测试剂盒(伯乐公司产)检测由轮枝镰刀菌制备的抗原时也可产生交叉反应[96]。这种情况主要针对轮生镰刀菌,因为从 FSSC 复合种和 FOSC 复合种中其他镰刀菌提取的抗原不会有类似的体外交叉反应。

(1,3)-β-D-葡聚糖虽没有免疫原性,但它是大多数真菌细胞壁上的一种重要多糖,可通过激活 β-D-葡聚糖敏感的蛋白水解凝固级联反应而在血清中被检测到。(1,3)-β-D-葡聚糖并不是镰刀菌存在的特异性标志物[99],但是研究表明它可在镰刀菌引起的菌血症和肺炎患者血液中检测到[97-98]。文献报道显示,当临界值设为 60 pg/ml 时,用(1,3)-β-D-葡聚糖检测 3 例侵袭性镰刀菌病患者镰刀菌感染的敏感性为 100%[98]。尽管对于侵袭性镰刀菌病患者(1,3)-β-D-葡聚糖检测的临床经验是有限的,但这个测试作为一项诊断检查对于疑似侵袭性真菌感染的患者还是很有价值的。在小鼠模型中,(1,3)-β-D-葡聚糖在整个感染过程中都维持很高的水平,这表明该标志物有可能成为侵袭性镰刀菌病检测的一种特异和敏感的诊断指标[100]。但是(1,3)-β-D-葡聚糖检测也存在一些假阳性,如肾衰竭患者和接受纤维素滤膜血液透析的患者[101]、使用某种免疫球蛋白制剂的患者[102]和接触过含葡聚糖纱布或相关耗材的血液标本(或患者)[103]。这强调了在临床诊断时,应结合(1,3)-β-D-葡聚糖监测结果与患者的临床症状和其他一些诊断结果,如 CT 检查等。

3. 核酸检测技术 虽然大多数镰刀菌可以通过显微镜下特征和菌落特征将其鉴定到属,但是若鉴定到种时需要分子生物学数据。目前,除了仅有的 2 种镰刀菌基因数据库在网络上供比对查询外,其他用于鉴定的分子生物学手段很少。在一项研究中,使用 PCR 方法在播散性镰刀菌病小鼠模型的感染组织中检测到镰刀菌 DNA[104]。在另一项研究中,基于 18S rRNA 基因序列设计出一种泛真菌 PCR 技术,并应用于 3 例疑似细菌性

或真菌性眼内炎患者的眼标本。尽管在内标样本中检测到镰刀菌，但没有在镰刀菌性眼内炎患者的临床样本进行分析[105]。PCR还应用于灰指甲患者分离出的镰刀菌菌种鉴定[106]。此外，使用实时定量PCR分析法可以在福尔马林固定、石蜡包埋的组织样本中检测到镰刀菌DNA[107]。鉴定出的镰刀菌种类与已知在免疫力低下的患者中引起弥散性镰刀菌病的种类相同。

已开发出可同时检测多种真菌（包括镰刀菌）的泛真菌PCR体系。在一项研究中，侵袭性镰刀菌病患者血标本泛真菌PCR检测为阳性，而同时该患者血培养得到FSSC复合种中的一种镰刀菌[108]。近期有研究报道，使用75类属特异性杂交探针的Luminex微球杂交技术，可从血液和肺部标本检测多种病原真菌，包括镰刀菌[109]。与其他条件致病性真菌检验一样，诸如PCR法的分子生物学方法已成为未来可致人类感染的镰刀菌检测和鉴定的希望，但是这些方法在患者感染诊断中的价值还有待进一步研究。

（七）菌种的分离程序

一般而言，镰刀菌营养要求不高，可在常规的真菌培养基上生长。考虑到镰刀菌在中性粒细胞减少症或免疫功能低下人群中易发生侵袭的特性，强烈推荐使用诸如马铃薯葡萄糖琼脂（potato dextrose agar，PDA）的一些真菌特殊培养基，因为在这种培养基上镰刀菌会形成典型的形态特征，从而有助于早期诊断。大多数镰刀菌在不含放线菌酮的PDA上生长迅速，因为放线菌酮可抑制镰刀菌生长。样本收集和处理的详细资料请参考第117章。

（八）鉴定

少部分镰刀菌能够通过一些重要特征进行鉴定，如表型特征、瓶梗形状、瓶梗产孢的数量（如单层瓶梗或多层瓶梗）、分生孢子的形成头状或成链状、小分生孢子和大分生孢子的形状和间隔、厚壁孢子的有无和排列方式、菌落特征（包括生长速度和菌落正反面的颜色）[110]、分生孢子的颜色。但是通过这些特征来鉴定镰刀菌需要极为娴熟的临床经验，同时还需有参考实验室提供技术支持。虽然镰刀菌可在大部分真菌培养基上生长良好，但培养基的选择会影响其菌落形态、颜色和分生孢子的形成。目前使用最为广泛的培养基有合成性营养琼脂、PDA、添加有灭菌康乃馨叶或氯化钾的自然水（Tap water）培养基[45,111]。需要注意的是使用营养丰富的培养基（如PDA）保存菌种反而会引起菌种退化。此外，分子生物学方法正应用于临床镰刀菌的鉴定[37,106,112]。随着基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱（MALDI-TOF-MS）的广泛使用，临床微生物实验室可以实现快速、准确地将镰刀菌鉴定到属和种的水平[113-114]。镰刀菌鉴定可在BSL-1或-2级的实验室中进行，具体生物安全级别要求因具体菌种而异[27]。处理镰刀菌临床分离株时应在生物安全柜中操作。

（九）分型系统

多位点序列分析技术（MLST）可鉴别曲霉菌和念珠菌，也可鉴别临床和兽医中有重要意义的镰刀菌[46-47,115-116]。近期，CLSI公布了一份应用DNA测序技术来鉴定细菌和真菌的文件[117]；与此同时，由国际专家组成的国际人与动物真菌学会（ISHAM）下辖的真菌鉴定委员会也初步推荐临床实验室使用分子生物学方法对曲霉菌、镰刀菌和毛霉菌进行分型[118]。这些将镰刀菌归类于某一种复合种的单基因（转录间隔区，ITS）指南是基于通过系统发育分析的[8-14]多基因位点测序[ITS和大亚基（LSU）核糖体DNA，*TEF*-1，β-微管蛋白（*β-TUB*），钙调蛋白（*CAM*）和RNA聚合酶的第二大亚基（*RPB*2）]来获得的知识。根据规则，如果ITS序列与GenBank/EMBL/DDBJ数据库中某一类型或者参考菌株的序列同源性超过99%时，待测菌株则为六大SC家族的一员。对于大部分具有临床意义的镰刀菌需要鉴定到种水平时，上述一些基因位点的序列资料是至关重要的[118]。NCBIGenBank网站对镰刀菌鉴定有重要价值，但由于具有较多的错误序列[119]，其应用仍有局限性。除此之外，网络上还有另外2个专门的网站提供镰刀菌鉴定用的资料[37-38]。

（十）血清学试验

已开发出常规的血清学试验方法，并用于检测有暴露于镰刀菌的特定患者人群，最常见于职业暴露或者室内环境潮湿问题[120-122]。这类人群体内可以检测到抗镰刀菌的IgG抗体。有研究发现，在尖孢镰刀菌引起的过敏性支气管肺真菌病

患者的血清中尖孢镰刀菌 IgE 和 IgG 抗体水平升高[123]。目前，抗镰刀菌抗体在侵袭性镰刀菌病患者临床诊断中的价值尚未进行评估。

(十一)抗菌药物敏感性试验

镰刀菌通常对大多数抗菌药物相对耐药[124]。镰刀菌对两性霉素 B 和三唑类的最小抑菌浓度(minimum inhibitory concentration，MIC)比曲霉菌的要高。体外研究发现，FSSC 成员和 FOSC 成员对两性霉素 B 和伊曲康唑有较高的 MIC，FSSC 成员的 MIC_{90} 分别为 4 和 >8 μg/ml，FOSC 成员的 MIC_{90} 分别为 1 和 >8 μg/ml[125]。在 FSSC 的进化枝 3 中发现了广泛的体外耐药性[126]，并且其他研究根据 EUCAST 推荐的方法进行多种药敏检测，任何被测试的药物均缺乏活性[127]。对于镰刀菌临床分离株，伏立康唑、泊沙康唑、伊曲康唑和雷夫康唑在体外抗菌活性不一，也可无活性[128-129]。在一个系列研究中，伏立康唑对 FSSC 复合种中某些种(报道为茄病镰刀菌)、尖孢镰刀菌、层生镰刀菌和轮生镰刀菌(又称串珠镰刀菌)存在一定的抗菌活性(MIC_{90} = 2 μg/ml)；尽管如此，此药物对大多数真菌不具有抗菌活性[130-131]。尽管伏立康唑和泊沙康唑在体外对镰刀菌只具有中等强度的抗菌活性，但这 2 种三唑类药物都曾成功治愈过一些两性霉素 B 耐药的镰刀菌病患者[132-134]。最新获得许可的三唑类药物艾沙康唑，未能显示出良好的体外抗镰刀菌活性[135-136]。棘白菌素在体外对镰刀菌无有效抗菌活性[137-138]。研究发现，*fks*1 基因可能是导致 FSSC 复合种中的某一种镰刀菌对棘白菌素天然耐药的原因[139]。对 FFSC、FCSC 和 FIESC 复合种中一些不常见的镰刀菌种类进行体外药敏试验研究发现，特比萘芬是一种最为有效的抗菌药物，但是这种药物对 FIESC 复合种中的一个镰刀菌种(或称变红镰刀菌)没有效果，两性霉素 B 是此种菌最有效的药物[88,140]。相对而言，特比萘芬对 FSSC 和 FOSC 复合种具有较高的 MIC_{90}[141]。协同研究发现，联合使用两性霉素 B 和泊沙康唑治疗尖孢镰刀菌感染的小鼠后，其生存期延长，并且真菌负荷量降低[142]；另外，对于一些导致眼部感染的镰刀菌，硝酸银也表现出一定的体外抗菌活性[143]。

(十二)结果的评价、解释和报告

早期诊断是镰刀菌病治疗中的重要环节，在最终的鉴定之前应该将分离到镰刀菌报告临床医生。除了极少数菌种外，根据表型特征和(或)其核糖体 DNA(rDNA)序列数据鉴定出的镰刀菌，在报告中还应说明其归属于哪一种复合种。

五、其他条件性感染透明霉菌

(一)分类

如表 123-3 所示，其他可引起人类或动物疾病的条件性透明丝孢霉菌分布在众多菌属中。这些霉菌中的少数是同宗配合的子囊菌和丝状担子菌，而另外大部分都属于子囊菌门中的无性型成员。这类霉菌中大部分都是无色透明或者只有淡淡的色素。但是，如顶端瓶霉属等一些透明霉菌会逐渐在中央产生黑色素。单胞瓶霉属、*Phialemoniopsis*[144] 和子囊壳属[以前称为油瓶霉属(*Lecythophora*)][145]等曾被列为暗色丝孢霉病的病原体，由于它们在培养基里普遍为浅色的，因此也包括在透明霉菌中。一些腔孢纲 oelomycetous，例如刺盘孢属和茎点霉属也包括在这里。不同于丝孢纲(hyphomycetes)产生裸露的分生孢子，腔孢纲的分生孢子需在半封闭或全封闭的结构产生，如分生孢子盘或分生孢子器中。腔孢纲引起的感染通常是由于创伤后某种形式的真菌植入引起而不是吸入获得[146-147]。虽然持续的分子特征将这些真菌置于更合适的系统发育分类中，但表 123-3 根据其表型特征概述了本章所包括的真菌。按照新的国际藻类、真菌和植物命名法，第 59 条多形真菌的双重命名法被放弃[148]，这里只使用最广泛接受的无性型或有性型名称(表 123-3)，即使进行无性型和有性型联系仍然很重要[149]。

(二)病原体的描述

1. 子囊菌纲(Ascomycetes) 同宗配合的子囊菌：同宗配合子囊菌或自交型子囊菌可以进行有性繁殖，部分原因是它们具有交配型自形体(即 *MAT*1-1 和 *MAT*1-2)，包括产生闭囊壳的菌属(没有开口或小孔的囊实体)，如嗜热子囊菌属、隐囊菌属和头鞘霉属；产生子囊壳(有小孔的囊实体)的菌属，如无毛毛壳菌属(图 123-1g)、毛壳菌属、小囊菌属(图 123-2c)和帚霉属；子囊孢子成簇裸露在外的菌属，如小裸囊壳菌属。嗜热子囊菌属是不具小孔的，嗜热子囊菌可在 50 ℃生长。它

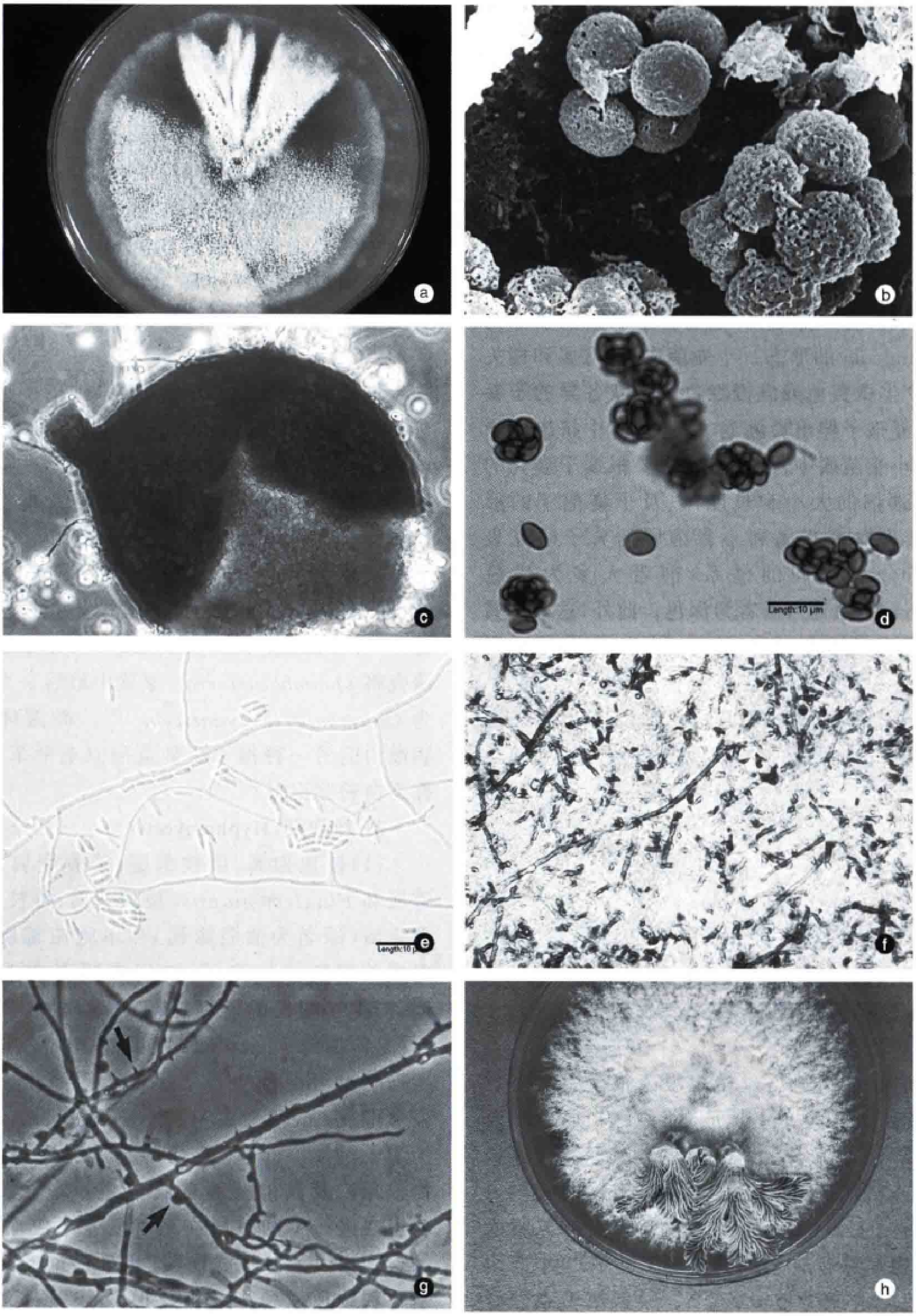


图 123-2 a. 30 ℃培养 15 天后，与图 123-1h 相同的透明孢小裸囊壳菌菌株在燕麦琼脂上变成黄色，有成簇的子囊孢子。b. 扫描电镜下观察的透明孢小裸囊壳菌的子囊孢子，放大倍数，×6000。c. 小囊壳属中的子囊壳。d. 康乃馨叶片琼脂培养 8 周，25 ℃，陷阱鞘菌属产生棕色子囊孢子。e. 陷阱头鞘菌中的单胞瓶霉样无性型，表现为 adelophialides（无隔且瓶梗减少）及椭圆形分生孢子。f. 六胺银染色后的组织切片，显示在肺部真菌球中普通裂褶菌的单核菌丝（无锁状联合）。g. 小培养的普通裂褶菌，显示锁状联合和细针结构，放大倍数，×580。h. 在马铃薯葡萄糖琼脂，光照条件培养 7 周的普通裂褶菌，显示其有菌褶的子实体的发育，见彩插

们产生浅黄色、椭圆形的厚壁子囊孢子和拟青霉样形态。隐囊菌属是一种角蛋白溶解子囊菌，特征为淡黄色，透镜形呈网状排列的子囊孢子和金孢子菌属、畸枝霉属样的形态。陷阱头鞘菌在扫描电镜下（图 123-2d）的特征为：闭囊壳囊实体覆盖有黄色至棕色的毛，子囊孢子上有凹痕或呈酒窝样，单胞瓶霉样无性型（图 123-2e）[150]。无毛毛壳菌属和毛壳菌属在囊实体内产生棕色、柠檬状或纺锤形的子囊孢子，其囊实体（特别是靠近开口的周围）表面有少量毛；一些物种形成类似枝顶孢属或 Humicola 的形态。小囊菌属、帚霉属和相关的菌种产生微黄色或浅橙红色的形状各异的子囊孢子，子囊孢子伸出长触毛（就像从管中挤出的牙膏）。在小囊菌属中，种属鉴定主要根据子囊壳的特征，如颈部的大小和长度，以及子囊孢子的形状。近年来对帚霉属和小囊菌属的分子研究表明，它们分属不同的谱系，前者大多为浅色（*S. asperula* 除外），后者为深色。此外，这 2 个属都含有形成子囊壳的同宗种[151-153]。短帚菌是环痕式产孢菌属中最常见的物种[28,152,154]（图 123-4f）。帚霉属是一种常见的土壤真菌，以其对纤维素基质的降解而著称。只有少数物种与人类感染相关，而且根据分子系统发育分析[151-153]，许多物种已经转移到小囊菌属。

小裸囊壳菌属可产生成簇的子囊孢子，其周围包绕着黄色或橙色的菌丝，但没有形成可鉴别的囊实体（图 123-1h、图 123-2a、图 123-2b）。本种的一个病例和参考分离物在皮炎芽生菌的 Gen 探针试验中均产生假阳性结果[155]。

2. 担子菌纲

裂褶菌及其他属：丝状担子菌很少引起人类疾病且其特征不突出。然而，那些已知的种属在体外难以培养。临床菌株出现菌丝锁状联合结构时可被鉴定为担子菌，但是这些诊断性的结构可能会缺乏。生长快速，能在 37 ℃苯菌灵琼脂生长，但不能在含有放线菌酮培养基生长的非产孢透明霉菌应考虑为担子菌[156]。尿素试验阳性时也支持担子菌的诊断；但是当评价阳性结果时，应考虑是否有污染。

普通裂褶菌被公认为是引起过敏性鼻窦炎、过敏性支气管肺炎及相关过敏性疾病的重要因素，也是引起免疫功能正常和免疫缺陷患者侵袭性感染的偶发因素[157]。临床分离裂褶菌属的最新分子特征表明，临床上较为常见的 *S. radiatum*，而不是普通裂褶菌[158]。培养分离出的 *S. radiatum* 或者普通裂褶菌可能是双核的，菌丝上产生有诊断意义的针状结构和锁状联合（图 123-2g），就像在光照条件下孵育的担子果（蘑菇）一样（图 123-2h）。其他菌株是单核的、不育而且无锁状联合，有时也无针状结构。当缺乏针状结构时，培养或组织中的普通裂褶菌菌丝就与曲霉或其他霉菌的菌丝相似[156,159-160]（图 123-2f）。单核菌株形态学鉴定比较困难，分子鉴定对于菌种鉴定是必要的[160-161]。

可引起人类或动物疾病的其他的罕见担子菌包括 *Tropicoporus tropicalis*［原名热带仙孔菌（图 123-3a）］[162-163]，树皮锐孔菌[164]、撒裂蜡孔菌[165]、白囊耙齿菌[166]、多年卧孔菌属[167]、草菇（*Volvariella volvacea*）[168]、产 Hormographiella 形态关节孢子的鬼伞菌属[169-170]、孢子丝菌样生物（即先前报道的变蓝孢子丝菌）[171]、蓝色柱孢霉[172]和 *Fugomyces cyanescens* [33]。系统发育学研究将 *Quambalariaceae* 家族中最后一个种命名为 *Quambalaria cyanescens*[155]。尚需确定其致病潜力的另一种担子菌是黄孢原毛平革菌（以前称为白粉侧孢霉）[173]。

3. 丝孢纲(Hyphomycetes)

（1）枝顶孢属、帚枝霉属、子囊壳属、单胞瓶霉属和 *Phialemoniopsis*：枝顶孢属、帚枝霉属、子囊壳属（原名为油瓶霉属）和单胞瓶霉属的真菌形成单细胞分生孢子，它们成团存在或链状排列，产生于细长的瓶梗或短的、间层的产孢细胞（就是所谓的 adelophialides）；在单胞瓶霉属中分生孢子也可由分生孢子座样物质产生。多源的枝顶孢属，原名为头孢霉（Cephalosporium），包括了大约 100 个种，它们与土壤、昆虫、污水、植物根际以及其他环境基质相关。分子数据为目前正在进行中的该属在系统发育系统中[27,174-175]的重构提供了证据。在美国，最常见的临床菌株是基利枝顶孢和产菌核枝顶孢-埃及枝顶孢[176]。最近对枝顶孢属和相关分类群的系统发育概述将一些临床物种归入帚枝霉属，如 *Sarocladium kiliense*、*S. strictum* 和 *S. bacillisporum*[177]。最近为先前归为枝顶孢属的几个未命名物种建立了 *Brunneomyces* 和 *Chordomyces* 属[178]。基于名称的优先级（自2013年1月起双重命名法取消）油瓶

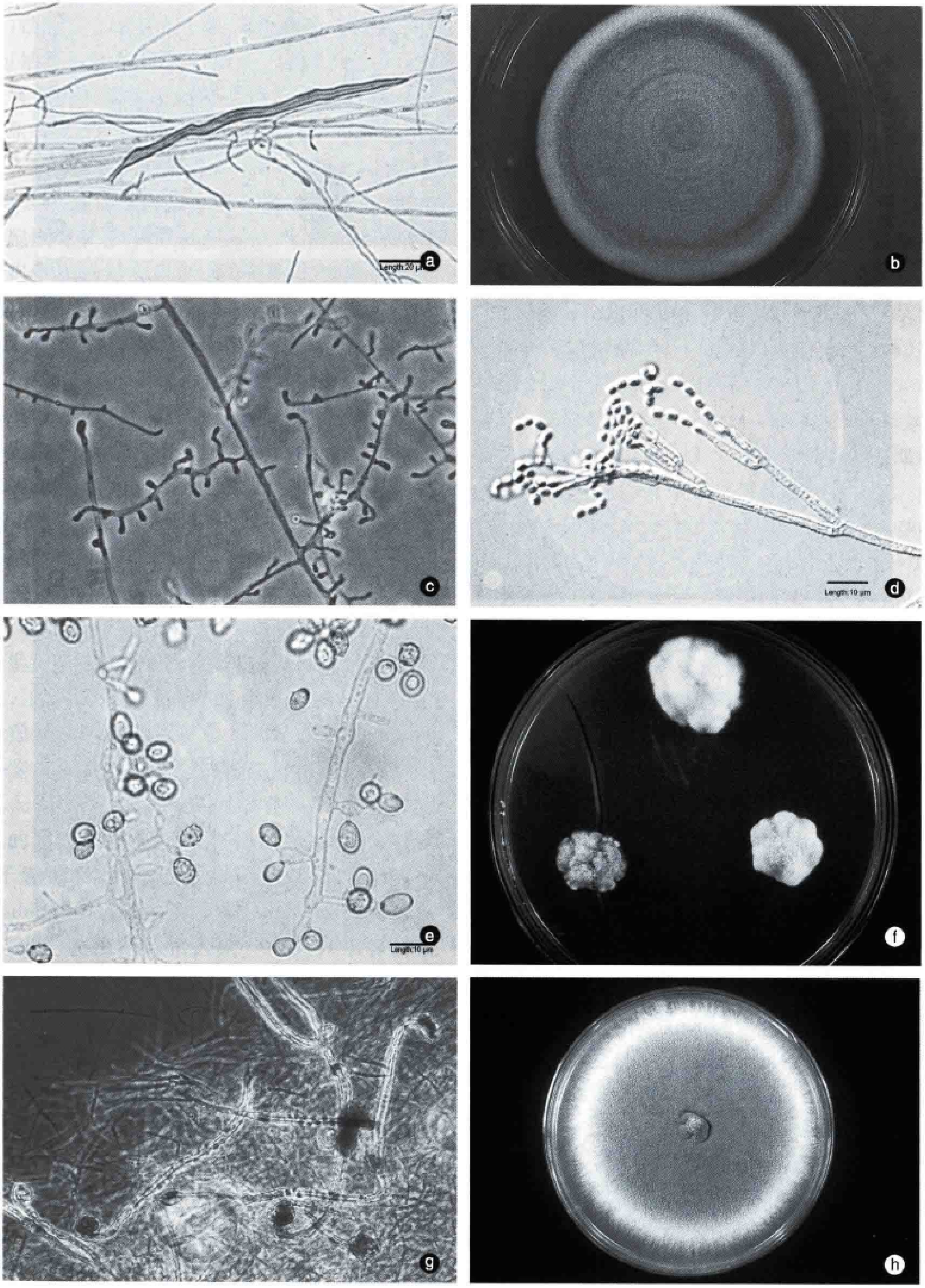


图 123-3　a. 在马铃薯葡萄糖琼脂 25 ℃培养 10 天，小培养热带仙孔菌的刚毛状菌丝，标尺，20 μm。b. 在马铃薯葡萄糖琼脂 37 ℃培养 14 天后，蝶形花金孢子菌（*Chrysosporium zonatum*）的菌落。c. 蝶形花金孢子菌在短曲茎上产生的分生孢子。d. *Rasamsonia argillacea* 的粗糙的茎、梗基和瓶梗；分生孢子最初是楔型的，标尺，10 μm。e. *Thermothelomyces thermophila* 各个成熟阶段的分生孢子。成熟的分生孢子为黑色且粗糙。标尺，10 μm。f. 在海藻糖琼脂上培养 5 周后，加拿大甲霉的 3 种不同菌株的菌落形态。g. 加拿大甲霉的刚毛（附属物）。h. 马铃薯葡萄糖琼脂培养 7 天后，多变拟青霉菌落，见彩插

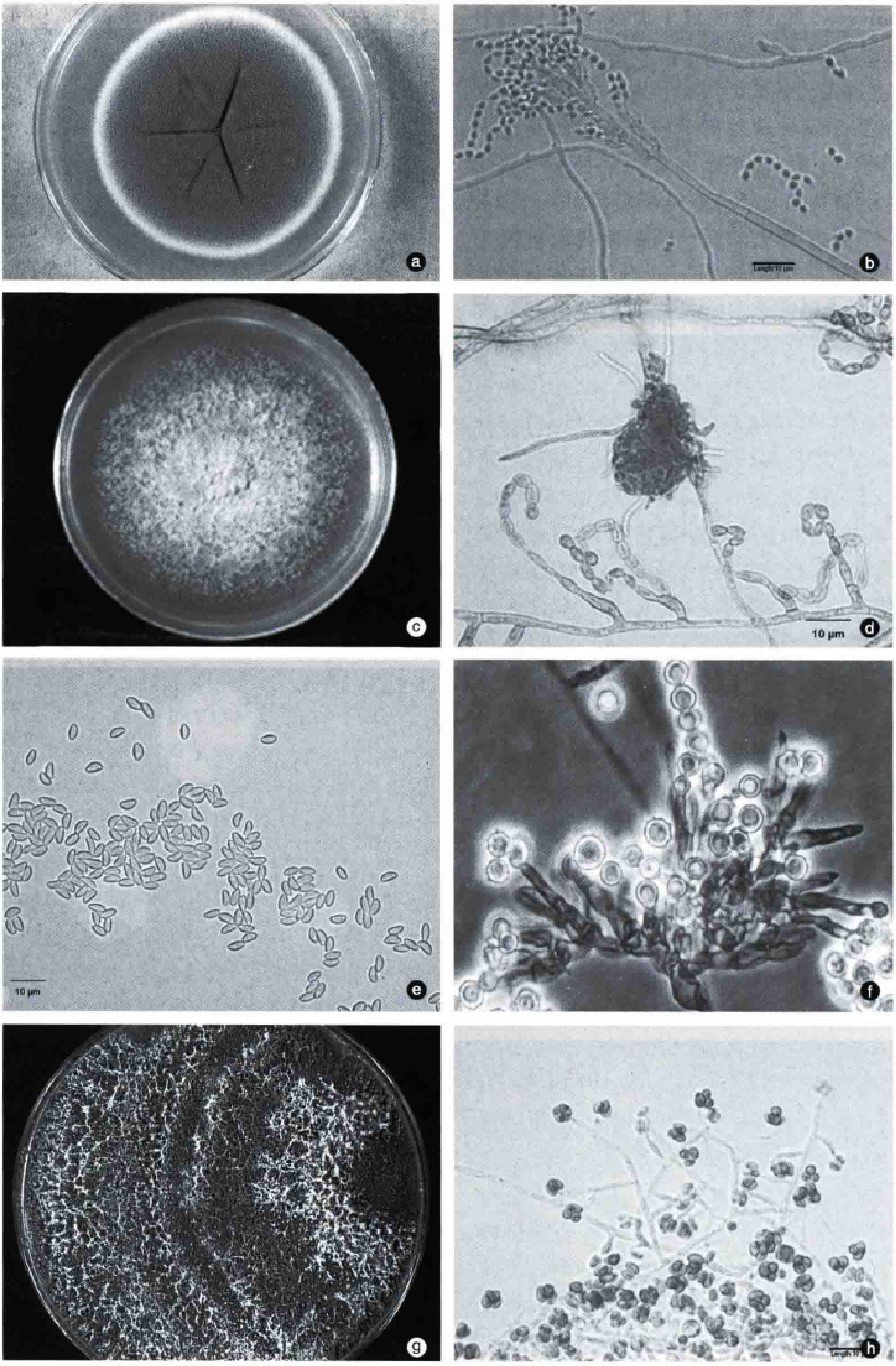


图 123-4 a. 在马铃薯葡萄糖琼脂培养 14 天后，淡紫紫孢菌的菌落。b. 淡紫紫孢菌的轮状分生孢子具有轮状瓶梗。标尺，10 μm。c. 马铃薯葡萄糖琼脂 25 ℃培养 14 天后 *Phialemoniopsis curvata* 浅黄色的菌落。d. *Microascus gracilis* 在马铃薯葡萄糖琼脂 25 ℃培养 10 天后，显示的无性形态和未成熟的子囊壳。e. *M. gracilis* 在马铃薯葡萄糖琼脂 25 ℃下培养 18 天后的子囊孢子。标尺，10μm。f. 短帚菌在环痕梗上产生的孢壁粗糙的分生孢子，其分枝为产孢结构，放大倍数，×580。g. 马铃薯葡萄糖琼脂 37 ℃培养 4 天后长梗木霉的菌落，注意该菌株只在一边接种。h. 长梗木霉的绿色、卵圆形分生孢子，标尺，10 μm，见彩插

霉属(包括了2个重要的种:霍夫曼油瓶霉和可变油瓶霉)被转入子囊壳属。目前子囊壳属包括了9个种,包括霍夫曼子囊壳和易变子囊壳菌[145]。单胞瓶霉属中的人类病原体包括倒卵单胞瓶霉和弯曲单胞瓶霉[27];倒卵单胞瓶霉仍然保留在该属中,并且加入了新的种,包括 *Phialemonium atrogriseum*(暗灰色枝顶孢)、胀单胞瓶属(胀萼拟青霉)、球形单胞瓶霉和 *P. limoniforme*[144,179]。然而,产生分生孢子座样结构的种属(先前被认为是弯曲单胞瓶霉)被转入 *Phialemoniopsis*。*Phialemoniopsis* 目前包括 *Phialemoniopsis curvata*、*P. pluriloculosa*、*P. cornearis*、*P. ocularis*,和 *P. hongkongensis*[144]。单胞瓶霉属的3个种先前是根据分生孢子形态,菌落颜色(包括倒卵单瓶霉中可扩散的绿色色素)来分类的[180]。然而,根据基于PCR的限制性片段长度多态性带型分析表明,弯曲单胞瓶霉和 *P. dimorphosporum* 之间有密切的亲缘关系,后一个物种的别名为弯曲单胞瓶霉[181]。随后,这些种归入 *Phialemoniopsis* 属中,依靠分生孢子座样特征将它与其他属区分。在形态学上,上述属十分相似,如果没有分子生物学特征将很难鉴定到种水平。因此,感染的许多报道并未鉴定到种[15,175]。寄生暗色枝顶孢及一些其他与人类感染相关种属的暗色枝顶孢可以通过棕色的菌丝和分生孢子与枝孢属鉴别(第127章)。子囊壳属和单胞瓶霉属形成没有基底隔(称作 adelophialides)、粗短的瓶梗或纺锤体形的瓶颈,借此与枝顶孢属相区别[180],但并不容易观察到这些区别。易变子囊壳菌区别于霍夫曼子囊壳的特征是,在产孢培养基上能产生棕色的附着厚壁孢子[145]。

(2)爪甲白癣菌、甲霉、柱顶孢属和新柱顶孢属:爪甲白癣菌、甲霉、柱顶孢属和新柱顶孢属是透明的或者暗色的产关节孢子的真菌。耐热的卡尔爪甲白癣菌是罕见的条件致病菌,可从皮肤、肺、角膜、溃疡及窦中分离到[33,182-183]。由于其初期是酵母样生长,人们大多不会向多形性霉菌方向考虑,而错误地选择用酵母菌鉴定的试验来鉴定它。其他物种包括 *A. curvata*、*A. longispora*、*A. chlamydospora* 和 *A. globosa*[184]。加拿大甲霉(图123-3f 和 图123-3g)是一种耐放线菌酮的丝孢菌。最近报道分离自呼吸道,包括肺部组织和鼻窦的 *Scytalidium cuboideum*[立体不甲白癣菌(*Arthrographis cuboidea*)],靠其橙色的分生孢子和黄色的立方体状关节孢子与同一个属的其他种区别。虽然还未证实它可引起疾病,但其能在37 ℃生长提示它有潜在致病性[185]。新双间柱顶孢包括以前被称为透明柱顶孢的透明丝孢霉,所以在这里提及[186]。

(3)僵菌属和侧齿霉属:白僵菌属和 *Parengyodontium*(既往称为侧齿霉属)通过合轴产孢的方式产生单细胞分生孢子。巴西安白僵菌种属复合体包括了对人类毒力有限的昆虫病原体[187]。*Parengyodontium album*(白色侧齿霉菌)与其密切相关[27],它是从白僵菌属中分离出来。最近的分子研究表明,*Parengyodontium*(*Engyodontium*)*album* 菌株形成一个单系簇,与其他侧齿霉属区分开,因此被赋予新的菌属命名[188]。

(4)金孢子菌属、毁丝霉属、*Thermothelomyces*、多齿菌属、髯龙菌属、*Paranannizziopsis* 和 *Ophidiomyces*:金孢子菌属(图123-3b 和图123-3c)、毁丝霉属、*Thermothelomyces*、多齿菌属和髯龙菌属(图123-3e)中的成员通常产生单细胞的分生孢子,由于其分生孢子裂开的方式,这些分生孢子称为粉分生孢子[30]。这些种属的成员与皮肤癣菌和双相性病原体相关,其共同特点是对放线菌酮具有耐受性以及产生有性型,它们被分类到爪甲团囊菌目子囊菌属[30,32]。多齿菌属分为4个属,其中最常见的临床种目前归属 *Thermothelomyces* 属的 *Thermothelomyces thermophila*(原名嗜热毁丝菌)[189]。最近描述的科爪甲团囊菌目,髯龙菌科包含 *Nannizziopsis*,*Paranannizziopsis* 和 *Ophidiomyces* 属(以前在金孢子菌属)[190-191]。

(5)绿僵菌属和木霉属(*Trichoderma*):绿僵菌(*Metarhizium anisopliae*)复合体是一种昆虫病原体,广泛分布,多位点系统进化分析表明,绿僵菌包括了多个种水平的谱系[192]。Driver 等[193]在2000年对该种属的分类学进行了修订,最新的属种界定是根据 Kepler 等[194]提出的"一种真菌/一个名称"概念。其产生的分生孢子呈链状排列并黏附在一起,而木霉属从黏端产生分生孢子。鉴别长梗木霉的形态学标准包括:① PDA 上快速生长的黄绿色菌落;②30 ℃培养有但在40 ℃培养时无可扩散的深黄色色素;③菌丝很少分枝,通常形成单个、长的瓶梗,并逐步变成圆锥形(圆柱

形);④ 光滑的、长圆形到椭圆形分生孢子(图 123-4g 和 123-4h)。中央瓶梗及厚壁孢子常见。2006 年发布了一个寡核苷酸条形码程序 TrichOKEY,用于基于核酸序列的菌种鉴定[195]。最近的分子研究已经阐明了临床相关物种[196],定义了 SCs[197],并提供了一个公认的木霉名称列表[198]。

(6)拟青霉属、囊孢菌属、顶端瓶霉属和 *Rasamsonia*:多元的拟青霉属是土壤腐生菌、昆虫寄生菌、生物降解剂,在世界各地均有分布。最近研究表明,在医学上重要的多变拟青霉实际上是 5 个种的复合体,其中多变拟青霉和 *P. formosus* 在临床上最为重要[199]。它们的亲缘关系是位于包括青霉属、篮状菌属和曲霉属的子囊菌纲发菌科(*Trichocomaceae family*)。嗜热子囊菌属(嗜热子囊菌科)也含有拟青霉样形态。多变拟青霉复合体的菌落(图 123-3h)及形态学特征在表 123-3 中描述。一个类似的物种,产生黄色扩散色素的马昆德拟青霉,不能在 37 ℃下生长,也没有被记录为疾病的病原体[200],最近被纳入绿僵菌属[194]。*Purpureocilliumis* 是医学上重要的淡紫拟青霉属的一个新属,现归入 *Ophiocordycipitaceae*[201]。菌落呈淡紫色,生长速度低于拟青霉,最大生长温度为 25~33 ℃,无厚壁孢子。

顶端瓶霉属耐热,具有潜在嗜神经组织特征,它广泛分布于温带到热带地区。菌落初期为苍白色,成熟后中心变黑。归类到纺锤孢拟青霉,它的特征是产生无分枝、笔直、棕色、有小刺的分生孢子,成簇排列,由足细胞和基底膨大的单瓶梗产孢细胞(偶尔多瓶梗产孢细胞)固定。分生孢子链状生成,可能出现独特的螺旋带[202]。这种生物表面上与多育赛多孢霉相似[203-204]。最近的分子研究表明,该属包括 3 个物种:梭孢顶端瓶霉 *Acrophialophora fusispora*、*A. levis* 和 *A. seudatica*,其中 *A. levis* 在临床最常见[205]。

Rasamsonia 从 *Geosmithia* 家族中分离出来,是发菌科中新的耐热或嗜热种属[206]。与青霉属不同,*Rasamsonia* 有粗糙的茎、梗基和瓶梗,以及楔形至椭圆形的分生孢子(图 123-3d)。*Geosmithia argillacea* 中的 *Rasamsonia argillacea* 会引起德国牧羊犬的播散性疾病[207],而且在囊性纤维化患者[208]和慢性肉芽肿患者[209]中发现了该病原体。最近的系统发育分析研究将这个种属复合体分类归至 6 个临床重要物种中[210]。

4. 腔孢纲(Coelomycetes)真菌 经常有报道称腔孢纲真菌会引起人类疾病,尤其是那些长期进行免疫抑制治疗的患者。不同于丝孢菌的吸入感染途径,腔孢纲真菌的感染途径是真菌直接植入。刺盘孢属和茎点霉属是最常见的 2 种种属。但是,对许多菌属的最新分类学修订综述不在本章范围之内[211-212]。刺盘孢属的种是偶尔也会引发疾病的 acervular coelomycetes。菌落生长快速,明暗不一,实验室鉴别它的典型特征是棕色、形态可变的附着孢。培养时,一些种的细菌可出现大量的蜜色的分生孢子、刚毛及菌核。Cano 等[213]描述了临床菌株的显著特点。目前正在进行解决隐性物种的研究[214]。茎点霉属中的菌种是有分生孢子器的腔孢菌,培养呈现苍白或较暗的颜色。它们的典型特征是深色的分生孢子器在琼脂表面生成或嵌入琼脂中。Boerema 等[215]出版了一本茎点霉属鉴定手册,然而,参考实验室最好掌握种间鉴别。最近 2 项针对临床实验室腔孢纲真菌的回顾性研究列举了几种经证实可引起疾病的菌种,描述了表型鉴定的显著特点,而且对特定的属/种细菌提供了体外抗真菌药物敏感性数据[216-217]。另见第 127 章 Coelomycetous 属。

(三)流行病学和传播

其他条件致病的透明真菌的传播方式及感染来源与曲霉病和镰刀菌病相似,其感染途径通常是通过吸入或创伤性植入。腔孢纲真菌虽然普遍存在,但报道大多来源于抵抗力低下个体的角膜炎和皮下真菌病[218],其最初通过外部接种获得[146]。

(四)临床意义

1. 子囊菌纲 同宗配合的子囊菌纲:毛壳菌属和无毛毛壳菌属(图 123-1g)是嗜神经的病原体,可引起颅内感染[42-43, 219],但球毛壳菌更多的是作为污染物出现,也是甲癣的罕见病原体[6,33]。小囊菌属也是深部感染的病原体,包括灰白小囊菌引起的心内膜炎[220]和脑脓肿[221],灰白小囊菌引起的播散性感染及三角孢小囊菌引起的致死性肺炎[222]。短帚菌(图 123-4f)和其他菌种是灰指甲的偶发病原体[30,32,154]。它们极少具有侵袭性,在免疫正常和免疫抑制的个体中引起甲癣、角膜炎、人工瓣膜心内膜炎、鼻窦炎、肺炎、脑脓肿及皮

下浸润和骨浸润是非常少见的[27,223-228]。已有研究发现，念珠帚霉和顶孢帚霉可以引起侵袭性鼻窦炎，但未阐述相关菌种的详细信息[229-230]。有报道显示，*Fuscoannellis carbonaria*，*Microascus croci* 或 *Microascus paisii*（以前都称为布朗帚霉）可引起肝移植和骨髓移植受者发生脑脓肿[151]，*Microascus cirrosus* 可引起侵袭性皮肤感染[224,231]。有病例报道显示，1 例肺移植受者出现致命的顶孢帚霉感染[232]。最近研究表明，从多数呼吸道标本中培养出来的许多其他菌种尽管未被证实是病原体，但仍可在 37～40 ℃的温度下生长[151-153]。另外罕见的种属包括小裸囊壳菌属（图 123-1h、图 123-2a 和图 123-2b）和头鞘菌属（图 123-2d,）。可见参考文献[27][155][220-222][224]和[233]。

2. 蛙粪霉纲 裂褶菌和其他属种：丝状担子菌与黑粉菌一样，会出现酵母样菌落（黑粉菌和腥黑粉菌），分离自呼吸道标本，有时也来源于血液；但很难评估它们的临床意义[156,234]。

普通裂褶菌是引发过敏相关的鼻窦炎和肺部疾病的重要因素，包括过敏性支气管肺真菌病，支气管黏液嵌塞[156,159-160,235-238]，以及免疫功能正常和免疫抑制患者的脑、肺、颊黏膜感染[33,156,237,239-240]。报道称灰盖鬼伞菌或其无性型 *Hormographiella aspergillata* 能引起白血病患者的人工瓣膜心内膜炎、致死性肺部感染，非霍奇金淋巴瘤患者的肺部脓肿，狗的真菌性角膜炎，以及皮肤病变[33,169-170,241-242]。研究报道在 1 例患有伴 X 染色体慢性肉芽肿疾病的患者中，*Tropicoporus tropicalis*（既往称为热带仙孔菌）引起骨髓炎[162-163]，而在另 1 例患有这种疾病的患者当中，也发现该菌的存在（D. Sutton，未发表资料）。撕裂蜡孔菌从 4 例肺部标本中分离出来[165]，白囊耙齿菌则在一个免疫抑制的儿童肺脓肿中发现[166]，多年卧孔菌属是肺部真菌球的病原体[167]，草菇在 1 例霍奇金淋巴瘤患者中引起了侵袭性感染，患者最终死亡[168]。1 例隆乳术患者感染了孢子丝样的菌种 *Quambalaria cyanescens*[243]。有关担子菌真菌和人类疾病的最新综述，请参见参考文献[157]。

3. 丝孢纲(Hyphomycetes)

(1)枝顶孢属、帚枝霉属、子囊壳属、单胞瓶霉属和 *Phialemoniopsis*：许多报道指出，枝顶孢属与指甲、皮肤、眼睛的感染及足菌肿相关（第 128 章）[27,30]。然而，现在许多这些菌种都被划分到其他种属。这些菌种可引起瓣膜置换术后、透析、移植、血液或实质性器官恶性肿瘤的患者的局限性和散播性的感染[6,15,27,175,244-245]。真菌血症也是一种常见的临床表现。有几例紧密帚枝霉（*Sarocladiumstrictum*）[直立枝顶孢（*Acremoniumstrictum*）]侵袭性感染已经被报道[246-248]。有研究发现易变子囊壳菌可引起糖尿病患者的人工瓣膜心内膜炎[249]。霍夫曼子囊壳可引起 HIV 感染患者的慢性鼻窦炎[250]。倒卵单孢瓶霉是心内膜炎的病原体之一[251]，*P. hongkongens* 会引起肝硬化患者出现皮下结节[252]，弯曲单胞瓶霉被报道是关节炎、真菌血症、血管内感染和眼炎的病原体[181,253-255]。

(2)爪甲白癣菌、甲霉和柱顶孢属：耐热的卡尔那爪甲白癣菌是一种罕见的条件致病菌，它可以从皮肤、肺部、角膜溃疡和鼻窦中分离出[33,182-183]。加拿大甲霉（图 123-3f,g）可引起远端指（趾）甲下甲癣，偶尔也会引起白色表浅性甲癣和平滑皮肤处感染[30,32,256-257]。虽然加拿大甲霉是一种比较少见的可引起甲癣的病原体，但新西兰、澳大利亚、欧洲和美国报道了 60 多病例，西班牙也有 2 例[258]。*S. cuboideum* 能在 37℃生长，提示这种菌具有潜在的致病能力[185]。

(3)白僵菌属和侧齿霉属：有数例真菌性角膜炎是由巴西安白僵菌引起的[259-260]。最近一项研究将巴西安白僵菌角膜炎分离株与美国环保署保存的菌株进行比对分析，结果发现它们之间无相关性[261-262]。文献还报道一种 35 ℃不生长的巴西安白僵菌，可引起急性淋巴细胞白血病患者发生散播性疾病[39]。白色侧齿霉菌是 2 例心内膜炎的病原体[263]，其中 1 例发生在牛瓣膜置换术中[188]。

(4)金孢子菌属、毁丝霉属、*Thermothelomyces*、多齿菌属、*Nannizziopsis*、*Paranannizziopsis* 和 *Ophidiomyces*：耐热的蝶形花金孢子菌是引起人类肺炎和骨髓炎的一种病原体[264]（图 123-3b, c）。一篇关于伊蒙菌属和金孢子菌属引起人类感染的综述指出，金孢子菌属引起的感染通常发生在免疫力低下的个体中[265]。据报道嗜热菌种嗜热毁丝霉（图 123-3e）[189]曾在 2 例患者中引起致死性主动脉血管炎，在 1 例脑外伤后继发脑脓肿患者的脑组织中分离出，并且也引起 1 例干草叉

刺伤患者继发严重的骨髓炎[266-269]。金孢子菌属的无性型 *Nannizziopsis vriesiii* 复合体也被称为 CANV 和 *C. ophiodiocola*[240]，已被归入到 *Nannizziopsis*、*paranannizziopsis* 和 *Ophidiomyces*。*Nannizziopsis* 似乎是唯一与人类疾病相关的物种[270]。

(5)绿僵菌属和木霉属：绿僵菌复合体包括了多种在系统发育有显著差别的物种，这些物种是广泛分布的昆虫病原体。文献报道这些真菌可引起人类角膜炎、鼻窦炎、侵袭性感染和播散性皮肤病变[271-274]。*Longibrachiatum* 中的木霉属，包括长梗木霉(图 123-4g,h)和拮抗木霉，可能是最重要的病原体[275-278]。最近一项对 73 株临床分离株的回顾研究，加深了对包括新物种 *T. bissettii* 在内的临床分离株的认识和理解[196]。

(6)拟青霉属、紫孢菌属、顶端瓶霉属、单纯瓶霉属和 *Rasamsonia*：多变拟青霉和淡紫紫孢菌感染的临床表现包括免疫功能正常和免疫抑制患者的皮肤及皮下感染、肺部感染、肾盂肾炎、鼻窦炎、蜂窝织炎、心内膜炎和真菌血症[6, 15, 27, 279-281]。对淡紫紫孢菌感染的临床表现、治疗方案及预后可参见已发表的综述[282-283]。这些菌属曾被发现存在于一些病房的配水系统中，如骨髓移植病房[201]。梭孢顶端瓶霉曾经引起角膜炎[255]、肺部感染[255-256]、1 例白血病儿童脑脓肿[202]，也常定植于囊性纤维化患者[257-258]。最近一次分子鉴定研究证实，该属包括 3 个物种：梭孢顶端瓶霉（与 *A. naniana* 和 *Masoniella indica* 同种）、*A. levis* 和 *A. seudatica*（*Ampullifera seudatica*），其中 *A. levis* 在临床上最常见[205]。*Rasamsonia argillacea*(原名为 *Geosmithia argillacea*)被认为是引起慢性肉芽肿患者发生侵袭性真菌感染的一种新型病原体[209, 284]，也曾被认为是造成 1 例免疫正常患者发生肺部和主动脉移植物感染的病原体[285]。该菌属是由 *R. argillacea sensu stricto*、*R. piperina*、*R. aegroticola* 和 *R. eburnea*[210] 组成的复合体，其中 *R. aegroticola* 是囊性纤维化患者最常见的气道定植菌[286]。

4. 腔孢纲真菌 刺盘孢属是一种重要的植物病原体，但偶尔也可以引起角膜炎[27]。临床也曾经报道过一些创伤后继发皮下感染的罕见病例[218]。此外，也有报道发现由茎点霉属引起暗色丝孢霉病的病例[287]。美国[217]和法国[216]的报道发现，许多其他菌属可从临床标本中检测出来。

(五)标本的采集、运输和储存

标本的收集、运输及储存方法的详细情况可参见第 117 章。对于其他侵袭性真菌病来说，感染的诊断比较困难，通常需要综合分析患者临床症状、真菌培养结果和影像学结果。在无菌部位能找到真菌，以及在显微镜下找到组织中真菌侵袭性生长的依据，为疾病的诊断提供了最有说服力的证据。

(六)直接检测

1. 显微镜镜检 组织病理学检查很难区分曲霉菌、镰刀菌和假阿利什霉[93, 227]。直接镜检偶尔也可以发现子囊孢子和小裸囊壳菌[155]，在普通裂褶菌的组织切片中也可观察到夹紧连接的孢子[239]。出芽的形式也是较罕见[92, 244-245]。

2. 抗原检测 检测患者(1,3)-β-D 葡聚糖以辅助早期诊断侵袭性透明丝孢霉病[97, 99]，但对这个指标的监测需要结合分析患者的临床症状和其他辅助诊断结果，例如，高分辨率 CT。

3. 核酸检测 核酸检测方法在直接检测临床标本中的多种透明丝孢霉方面具有较大潜力，但在临床诊断中的应用还很有限。近年来有报道显示，Luminex 微球杂交技术可从临床血液标本和肺组织样本中直接检测出各种真菌病原体[109]。这种方法对各种侵袭性真菌病原体的早期检测和鉴定有着良好的应用前景。

(七)分离步骤

条件致病性透明霉菌培养要求不高，普通培养基上即可生长，但是培养时应同时使用含有和不含有放线菌酮的培养基。培养基中添加终浓度为 10 mg/ml 的杀真菌剂苯菌灵(benomyl)能有效区分丝状的担子菌和子囊菌，前者对苯菌灵耐药，后者则敏感[288]。腔孢纲类真菌在大部分真菌培养基上生长良好，然而，若不延长培养时间(某些菌属需数周)，培养基观察不到此类菌生长[146]。关于初始接种和分离如何选择培养基请参见第 117 和 118 章。

(八)鉴定

更多关于透明霉菌的详尽描述可在一些鉴定

手册及其参考文献中找到[26-35]。许多真菌很容易鉴定到属的水平，但是大多数临床相关的霉菌需要借用 DNA 序列信息才能鉴定到种的水平。此外，在霉菌属和种的层面，MALDI-TOF 质谱仪具有潜在的快速鉴定能力[113]。本文中霉菌的重要表型特征请参见表 123-3。根据 DNA 序列数据鉴定培养基中不育菌株的方法，在很大程度上取决于可公开访问的数据库的准确性和数据解读，这些数据库包括 NCBI 基因库（https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/）、荷兰真菌多样化研究中心（前身为 CBS；http://www.westerdijkinstitute.nl/）和 ISHAM 数据库（http://its.mycologylab.org/）。基于 DNA 序列对几种非孢子菌的鉴定[289]证明了这种方法的有效性，该方法将继续得到更广泛的应用。

（九）分型系统

尽管临床分离株的比较序列分析在大型的教学医院和研究中心变得越来越普遍，但相当不规范。采用的 DNA 提取方法很多[290]，并且也对一些不同的基因序列和片段进行了测序[8-14, 17, 57, 117-118, 291-292]。然而，需要强调的是，许多公开访问的数据库条目是不正确的，导致非表型相关的比较序列分析面临挑战，因此要求顶部序列要严格匹配[118]。另一方面，分子生物学特征已作为种属分类和更好地理解具有临床意义真菌的进化关系的金标准[8-14, 57, 293]。此外，全基因组测序技术可能成为真菌基因组分型的一种新标准，如最近的一项研究确定了 *Sarocladium kiliense* 是引起多个国家暴发性血流感染的病原菌[294]。

（十）血清学试验

目前，血清学方法对于检测不常见条件致病性透明真菌的临床诊断价值不大。

（十一）抗菌药物敏感性试验

罕见的透明霉菌对不同抗菌药物的敏感性不同。对不常见霉菌的药敏试验对于经验性抗真菌治疗是有用的，但分离株应单独进行评估，以便进行适当的患者管理。对于已发表的体外药敏试验数据，详见相关菌属的参考文献。有研究发现两性霉素 B 单用或者联合使用伊曲康唑对毛壳菌属感染的治疗效果不佳[295]，然而，伏立康唑和试验性药物雷夫康唑及阿巴康唑在体外对毛壳菌属真菌具有潜在的抗菌活性，最小抑菌浓度低于 0.5 μg/ml[295]，但棘白菌素类的米卡芬净体外对该菌的抗菌活性弱。在一项抗真菌活性的评估研究中，共收集 44 例临床分离的丝状担子类真菌，包括 5 例普通裂褶菌，8 例鬼伞菌属，14 例苍烟管菌（*Bjerkandera adusta*）和 17 例未知的担子纲类真菌；试验结果显示：与氟康唑和氟胞嘧啶相比，两性霉素 B、伊曲康唑、伏立康唑和泊沙康唑对实验菌株具有相对较低的 MIC 值[296]；但种属之间差异并无统计学意义。

抗真菌药物包括两性霉素 B 和伊曲康唑对帚霉属体外抗菌活性有限，并且伏立康唑和特比萘芬的抗菌效果也与其他报道存在差异[141, 297]。在体外研究短帚菌药敏结果发现，特比萘芬和氟康唑、伊曲康唑和伏立康唑 2 种联合使用的组合之间存在协同效应，但目前这个发现还缺乏临床治疗经验的证实[298]。采用欧洲抗菌药物敏感性试验委员会（European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, EUCAST）规则对拟青霉属菌种药物敏感性试验进行评估[127, 299]，发现两性霉素 B、伊曲康唑和棘白菌素对 27 株淡紫紫孢菌的抗菌活性弱，但较新的三唑类如伏立康唑、雷夫康唑、泊沙康唑和烯丙基胺特比萘芬 MIC_{90} 较低。相比之下，31 株多变拟青霉对除伏立康唑和雷夫康唑以外的所有上述抗真菌药物的 MIC 值都较低[300]。关于艾沙康唑对少见的透明丝孢霉的体外药敏试验研究非常有限。一项研究发现，艾沙康唑对于 *S. kiliense* 没有活性，对于 *P. lilacium* 抗菌活性非常有限[301]。

（十二）结果的评价、解释和报告

对由镰刀菌和其他透明霉菌引起的侵袭性透明丝孢霉病的早期诊断往往是真菌感染预防与控制工作中的关键环节。当检测出不常见的透明霉菌时，应结合患者的免疫状态、分离的部位和次数来进行综合分析并评估其临床意义。

感谢 Lynne Sigler（University of Alberta Microfungus Collection & Herbarium, Devonian Botanic Garden, Edmonton, Alberta, Canada）对本节的富有帮助的评论和复阅。

对公司名称及贸易产品的提及并不意味着他们较其他未被提及的公司和产品被美国农业部认可或

推荐。美国农业部是一个平等机会的提供者和雇主。

本章献给 Deanna A. Sutton(2017 年 7 月 4 日去世),感谢她的善良和奉献,以及她的合作精神;她在临床真菌学诊断领域的众多贡献将永远被铭记。

参考文献请扫二维码查阅

第124章　系统性和皮下毛霉病与虫霉病的病原体

DEA GARCIA-HERMOSO, ALEXANDRE ALANIO,
OLIVIER LORTHOLARY, FRANÇOISE DROMER

（廖康　译；李轶、陆玲　审校）

毛霉病和虫霉病是由环境中无隔丝状真菌引起的侵袭性真菌感染。毛霉病由无处不在的毛霉菌引起，通常发生在免疫功能低下的患者或糖尿病患者。该类真菌可引起鼻、脑、肺、皮肤或播散性感染，其特征是侵犯血管、坏死；尽管目前有抗真菌和外科的治疗，其导致的感染仍具有严重的预后。虫霉病大多发生在免疫功能正常的宿主，主要由虫霉目（引起耳霉病）和蛙粪霉目（引起蛙粪霉病）真菌引起，这些真菌主要分布于气候温暖的地方。虫霉病表现为皮下感染，在无外科治疗下长期唑类治疗预后良好，但可能出现毁形性后遗症。

一、分类

真菌的分类在过去的几十年里一直在不断地修改。最近，一项基于多位点序列的系统发育分析研究[1]提出了一种可接受的分类方法：1个界，1个亚界，7个门，10个亚门，35个纲，12个亚纲，129个目。最重要的修改是创立包括子囊菌门和担子菌门成员的双核菌亚界及接合菌门和壶菌门的重新分类。引起毛霉病的病原体（毛霉目）和虫霉病的病原体（虫霉目和蛙粪霉目）传统上被分配到低等真菌的接合菌门。在Hibbett等[1]的研究中，由于接合菌门具有多元性，因此接合菌门不再被认可。对球囊菌门和4个分类位置不确定的亚门之间的菌种重新划分：毛霉亚门（包括3个目：毛霉目、内囊霉目和被包霉）、虫霉亚门（虫霉目）、捕虫霉亚门（捕虫霉目）、梳霉亚门（包括梳霉目、双珠霉目、钩孢毛菌目和内孢毛菌目）。

过去数年间，对毛霉目成员之间的进化相关性进行了研究[2-4]。此类研究结果表明在各科（枝霉科、毛霉科和刺枝霉科）与属如犁头霉属和毛霉属间有多元性。最近，基于4个分子标志的系统发育分析，对毛霉目的家族结构进行了研究[5]。跟足科是新近建立的一个科，包括根霉属和其他病原菌。

其他属的修订已在最近几年出版，详见下文[3,6-10]。值得注意的是，2009年首次发表了毛霉目少根根霉基因组的序列分析[11]。对于卷枝毛霉卷枝变种基因组注释，可参见（http://www.broadinstitute.org）。

表124-1参考Hoffmann等[5]发表的新的毛霉目家族构成，列出目前认为对人类致病或潜在对人类致病的毛霉菌种。

最近虫霉亚门被提升为虫霉门。多基因系统发育分析证实了这些生物的单系性[12-13]。这个新建立的门由250多个种组成，包括3个纲（蛙粪霉纲、新接霉纲和虫霉纲）和6个科（蛙粪霉科、新接霉科、新月霉科、蕨霉科、虫霉科和Meristracraceae科）。虫霉属有25种以上的菌种，但是仅有3种菌（冠状耳霉菌、闪光耳霉菌和异孢耳霉菌）曾经从临床样本分离到；蛙粪霉属中仅蛙粪霉是引起人类感染的病原体[14-15]。

二、毛霉病

（一）流行病学和传播

毛霉目真菌广泛分布于环境中（土壤、植物和腐烂的有机物质）[16]，是植物感染的常见病原体，

表 124-1 引起人类毛霉病的毛霉目物种(毛霉亚门)

科	属	种
横梗霉科	横梗霉属	伞状横梗霉(原名:伞枝茎霉，伞枝犁头霉)
		分枝横梗霉(原名:分枝犁头霉)
		透孢横梗霉(原名:华丽犁头霉)
	根毛霉属	微小根毛霉
毛霉科	毛霉属	卷枝毛霉
		印度毛霉
		M. velutinosus
		不规则毛霉(原名:多变根毛霉多变变种)
		多分枝毛霉
	放射毛霉属	雅致放射毛霉
	科克霉属	屈弯科克霉
瓶霉科	瓶霉属	*S. vasiformis*
		红孢瓶霉
		椭孢瓶霉
	鳞质霉属	雅致鳞质霉
		梯形鳞质霉
		骨状鳞质霉
		多变鳞质霉
跟足科	根霉属	小孢根霉
		少根根霉(原名:米根霉)
		希泊拉根霉菌(*R. schipperae*)
共头霉科	共头霉属	总状共头霉
小克银汉霉科	小克银汉霉属	灰色小克银汉霉
		刺孢小克银汉霉

可导致谷物和食品的污染,如水果或面包。空气中的孢子被认为是导致疾病的感染微粒,特别是在免疫功能低下患者,这也解释了最常见的感染部位(皮肤、鼻窦和肺)。在法国的一项病例研究中指出免疫功能正常的患者可能会发展成创伤后皮肤感染,占所有毛霉菌确诊病例的18%[17]。另外,最近有报道毛霉菌是引起密苏里州乔普林[18]一次龙卷风后坏死性皮肤病、阿富汗地区[19]战争相关伤害后感染的原因。这些真菌易引起实验室污染,是医院感染甚至暴发流行的来源[20-25]。这些真菌特定的地理分布和环境生态会在相关章节中进行描述。

根据一些单中心研究报道,毛霉病的发病率越来越高[26-30]。在对法国医院记录进行的一项回顾性分析中,研究小组提供了一项基于人群的十年内毛霉病的发病率及发病趋势[31]。利用2个有效的信息数据,通过捕捉—重捕方法,更好地估计了毛霉菌感染的实际负担[32]。同时,发现不同的地区发病率不同,可以从国家的层面去解释地区生态特异性[33]。发病率随时间显著增加,年平均发病率为 $0.9/10^6$,与1992—1993年在加利福尼亚($1.7/10^6$)[34]和2005年在西班牙($0.43/10^6$)[35]进行的基于人群的研究报告的发病率不同。如此增长的趋势在法国得到进一步证实[36]。男女比例(1.8∶1.1)和平均年龄(38.8~57.1岁)与1940—1999年在法国发表的929例病例的综述存在差异[31,37]。

糖尿病是毛霉菌病的主要危险因素(法国为23%,其他地区高达36%,其中20%为1型糖尿病)[17,37-38]。最近有文献报道糖尿病相关毛霉菌病的发病率在法国[31]和印度北部的三级护理中心显著增加[39]。后者的研究中,178例患者131例是未受控制的糖尿病患者,占73.6%;更重要的是,毛霉菌病导致56例糖尿病的诊断(占糖尿病病例的42.7%)。在157例小儿病例中,也有15%(1型糖尿病占13%)存在糖尿病[40]。糖尿病是导致白血病和(或)骨髓移植患者出现毛霉菌感

染的一个独立危险因子[27]，并严重影响实体器官移植(solid organ transplantation，SOT)期间毛霉菌病的发生[17,41]。值得注意的是，糖尿病相关性毛霉菌病最常见的临床表现是鼻窦炎。在法国占血液系统恶性肿瘤患者50%的急性白血病[17](严重中性粒细胞减少或复发)或异基因干细胞移植患者更容易发生毛霉菌病，肺部是最常见的发病部位。在移植物抗宿主病的情况下[27-28,30,42-46]，毛霉菌病通常发生在移植后3个月以后。目前，毛霉病占骨髓移植患者侵袭性真菌感染的7%到8%[47-48]。正如20世纪90年代在美国的一个中心[30]已经关注到的那样，在法国血液恶性肿瘤或干细胞移植患者毛霉菌病的发病率增加[31]。在这些人群中，有报道称暴露于缺乏抗毛霉菌活性的抗真菌药物如伏立康唑和卡泊芬净可能是潜在的风险因素[27-28,41,49-52]。

毛霉菌病占实体器官移植期间侵袭性真菌感染的2%，主要是在肾移植中[53]。在最近一项有关实体器官移植受体的国际前瞻性研究中，肾功能衰竭、糖尿病和以前使用伏立康唑和(或)卡泊芬净与毛霉菌病的风险较高有关，而他克莫司的风险较低[41]。肝移植受者较其他实体器官移植受体更易发生播散性疾病，并在移植后较早发生感染。

毛霉病也会出现在艾滋病病毒感染患者或静脉吸毒者中。它还影响皮肤损伤接触污染土壤的健康人，在一些研究中，该类患者占近20%。最后，它可能表现为社区获得性疾病或与医疗保健有关的疾病。对1970－2008年发表的病例进行仔细审查后发现169例与医疗相关的毛霉菌病病例(其中29%发生在儿童中)，其中72%在1990年以后发表[21]。毛霉病的暴发很少见，但与建筑施工和使用受污染的胶带、造瘘袋或木制压舌板有关，最近的暴发与受污染的“亚麻布”有关[24]。

(二)临床表现

局部感染和播散感染需要进行区分[44]。在最近3个系列的报道中[17,37,54]显示最常见的局部感染是鼻窦炎和肺炎，分别占25%～39%和24%～30%。在血液系统恶性肿瘤患者中播散率从3%至超过50%(在某种程度上取决于基础疾病和感染部位)[37,44-45]。

在糖尿病患者和静脉吸毒者中鼻窦感染(孤立性鼻窦炎、鼻脑和眼眶感染的形式)是最常见的表现，肺部感染是第二位常见的表现；血液病患者的情况正好相反[27,37]。感染导致坏死和出血，可能表现为局部感染或者播散感染。在血液系统恶性肿瘤患者中临床表现与侵袭性曲霉菌病相似。反晕轮征可能提示毛霉菌病的可能[55-56]，但不特异[57-58]。在最近的一项对58例SOT毛霉菌病患者进行的研究中，肺部感染31例(53%)，其中23例为局限性感染[59]。

在免疫功能正常的宿主中局部皮肤感染最常见[37]，通常发生于伤口被空气中的孢子或者土壤污染[60-62]、较少发生于手术或者烧伤后[23]。局部扩散和血行播散可能会发生。相反，从其他位置播散导致皮肤感染是罕见的。

颅内感染可合并鼻窦炎或独立发生，尤其是在静脉吸毒者中。认知障碍和局灶性神经功能缺损是常见的表现。胃肠道病变在7%的病例中有描述，发生在低出生体重儿、早产儿和营养不良者及腹膜透析后[37]。它们引起腹痛和消化道出血，并发症包括消化道穿孔、腹膜炎和扩散至肝脏。

(三)治疗

1. 预防感染　在免疫功能低下的患者中，预防性使用唑类药物(如氟康唑或伊曲康唑)是没有益处的，因为它们对毛霉菌[30,45-46]缺乏(主要)活性。最好的预防措施是减少环境暴露，特别是使用高效微粒空气过滤房间[45]。泊沙康唑作为预防毛霉菌病药物特殊作用尚未得到证实[63-64]。尽管泊沙康唑自2007年起已上市[33]，近年来血液患者群中该病的发病率并没有下降。此外，尚未有艾沙康唑预防毛霉菌病的研究。

2. 药物治疗　在Roden等[37]的总结中，未经治疗患者的生存率为3%，接受抗真菌治疗患者的生存率为64%。尤其是对于鼻脑感染和局限性的皮肤感染，内科药物治疗联合积极的外科治疗，同时尽可能改善其基础疾病(如纠正酸中毒、高血糖、恢复白细胞数目、调整免疫抑制剂的使用等)会显著提高患者的生存率[65-66]。

在病程早期给予两性霉素B(amphotericin B，AMB)脂质衍生物可能比AMB脱氧胆酸盐更有效且耐受性更好[67]。在常规剂量治疗失败的患者中，使用大剂量脂质体AMB可获得较好的临床效果[68-69]，因此，2种方法中的1种(脂质复合体或者脂质体)应该作为一线治疗[70-71]。在美国，艾沙康

唑已被批准用于毛霉菌病的治疗；在欧洲，当两性霉素 B 脂质制剂不合适时，艾沙康唑最近已成为一线替代品。

此外，已有文献记载艾沙康唑在有限数量的患者中被记录为一线治疗，在生命活力研究的第 12 周的缓解率为 10%[72]，而在 AmBizygo 的研究中，脂质体两性霉素 B 的缓解率为 48%[73]。泊沙康唑口服片剂或静脉制剂只能考虑二线治疗，不应使用铁螯合剂例如地拉罗司，棘白菌素类联合多烯类可作为二线治疗的选择。全球病死率为 47%～84%[37]。鼻脑型感染的死亡率 20%～69%[29,39]。在血液系统恶性肿瘤患者的生存率比糖尿病患者中的生存率低[17]。

(四)标本的采集、运输和储存

毛霉病是进展最快的侵袭性真菌感染之一。毛霉病的诊断应视为危急情况，因为延迟治疗会影响预后[74]。尽管临床特征缺乏特异性，一些早期的影像学特征使毛霉菌病的诊断相比其他侵袭性真菌感染尤其是侵袭性曲霉菌病[58]更有可能。众所周知的高危因素与临床和(或)影像学特征必须提醒医生，并立即进行诊断。由于目前用于侵袭性真菌感染诊断的方法是基于抗原的检查，而毛霉菌并不产生[75]，因此确诊主要依靠对组织、体液或者渗出液进行直接涂片检查、真菌分离培养和(或)核酸检测，血培养并不适合用于诊断。对于高危患者，应该在无菌条件下从深部病变和无菌部位迅速采集足够数量的标本。较大的标本量会增加分离到真菌的可能性，同时可进行多项检测(直接涂片检查、培养、提取 DNA 进行 PCR、组织病理学)及存储标本用于进一步分析。对于鼻脑感染可采集鼻涕、刮取分泌物、鼻窦穿刺或取血管坏死区组织。对于肺部感染可采集痰、支气管吸出物和支气管肺泡灌洗液进行检查。考虑到这些标本的敏感性较低[76-77]，如果检查阴性，可以使用经纤维支气管镜或经皮 CT 肺部病变穿刺活检，但是要注意诱发并发症的风险[78]。

用于组织固定的甲醛会抑制真菌的生长，因此标本必须分别进行微生物学和组织病理学分析。直接涂片检查仍然是最快速的诊断技术；培养仍然是检测抗真菌药物敏感性必不可少的重要步骤。在种水平上可靠的鉴定仍然依赖于从培养物中获得菌株。运输容器应无菌，加入几滴生理盐水保湿。标本不应冷藏，应在采集后 2 h 以内送到实验室并迅速进行处理，因为毛霉容易被破坏，同时对环境比较敏感[79]。由于菌丝无分隔，活检标本的研磨对于毛霉菌培养是不利的。活检标本应切成小片，然后直接进行涂片检查和培养。

(五)直接涂片和组织病理学检查

在临床标本中发现菌丝可以为毛霉病的诊断提供有力证据。由于毛霉目真菌存在于环境空气中，可以在非无菌标本中以分生孢子的形式存在，从而导致培养结果假阳性。直接检查是重要诊断标准的 2 点原因：①临床标本的培养常为阴性[80]；②组织病理学需要多个步骤，导致延误诊断。

显微镜检查可将标本用湿片法或滴加氯唑黑后直接检查。光学增亮剂(钙荧光白、Blankophor 或 Uvitex 2B)可将细胞壁中的几丁质特异性染色，同时再加上一个促溶剂如氢氧化钾，会有更好的敏感性[76]。第 2 天再次检查玻片是一种较好的方法，尤其是对于厚的样本，因为由于组织的解离不充分，可能导致假阴性的结果。

毛霉菌菌丝的形态特征具有特异性，可将其与其他真菌如曲霉菌、镰刀菌或者赛多孢霉进行区分。毛霉菌菌丝粗大(5～25 μm)、不规则、透明、没有或者少量分隔、薄壁飘带状。经常观察到菌丝表现出扭曲或折叠的外观。不同于透明丝孢霉菌丝的锐角(45°)分枝，宽大分枝(≥90°)提示毛霉目真菌。如果菌丝被破碎，典型的特征会丢失，从而导致直接镜检很难做出可靠的诊断。在经过六胺银或过碘酸雪夫染色后的组织标本中可以观察到同样的特征。值得注意的是 HE 染色难以检测出毛霉菌。有时，如果仅存在少量菌丝并且组织切片贯穿菌丝的横截面，它可以产生酵母样形态或呈空泡状，使形态难以辨认。通常毛霉侵犯静脉和动脉血管壁，同时经常伴随周围组织的梗死。炎症反应是多种多样的，从没有任何表现到单纯的中性粒细胞浸润、肉芽肿性反应或两者结合在一起，也可以表现为神经周围炎症浸润[81]。基于商业化的免疫组化技术可以在疑难病例中使用[82]。

(六)抗原检测

目前还没有特异性抗原检测方法可用于毛霉病的诊断，β-D-葡聚糖的检测对毛霉病的诊断无帮助。

(七)菌株分离程序

从临床标本中培养毛霉困难，只有 15%～25% 的病例培养阳性[80]；然而，培养适合于毛霉病的确诊，尤其是直接涂片检查阴性的病例，需要注意的是半乳甘露聚糖抗原检测阴性可能间接提示毛霉菌感染。临床和影像学特点对侵袭性真菌感染缺乏特异性，不能区分毛霉和其他如曲霉、镰刀菌属或赛多孢霉等深部真菌的感染，尤其是在血液病患者中。然而，不同真菌的治疗手段是不同的，真菌培养有时是唯一的诊断要素。培养对于种水平的鉴定也是至关重要的，尤其是在组织中形态结构不典型的情况，同时可以对分离的菌株进行真菌药敏试验[83]。首先，培养通常在营养丰富的平板如含有抑制细菌生长抗生素的沙氏葡萄糖琼脂培养基；不应该使用含有放线菌酮的平板，因为会抑制一些真菌生长。接种后，平板需要在 25～30 ℃ 和 37 ℃进行培养使耐热和不耐热的菌株都可以生长[84]。沙氏葡萄糖琼脂培养基往往不适合用于形态鉴定，在土豆葡萄糖琼脂培养基(potato dextrose agar，PDA)上培养更适合。

(八)临床标本中核酸的检测

在很多病例中组织病理学和(或)直接涂片检查是阳性的，但培养阴性。尽管如此，菌株的鉴定对于流行病学研究及种特异性的抗真菌药敏分析是非常重要的。基于 PCR 的分子鉴定可以用福尔马林固定、石蜡包埋[85]、冷冻或新鲜的组织标本。固定过程会使 DNA 碎片化，从福尔马林固定、石蜡包埋组织中提取 DNA 通常质量较差[86]。此外相对大量的人类 DNA，提取的真菌核酸通常量很少。因此，基于 PCR 的鉴定必须依赖于 DNA 小片段的扩增，理想情况下应能够通过序列区分物种。基于内转录间隔区 ITS1 和 ITS2 的引物进行 PCR 并进行测序的方案已提议用于用福尔马林固定、石蜡包埋的实验性毛霉病小鼠组织样本[87]。对于用于福尔马林固定石蜡包埋的人类组织也已进行了评估，并根据组织病理学报告，对 18 例无隔膜菌丝的标本中的霉菌进行了鉴定，检测出 7 例[85]。基于 18 S 核糖体 DNA 位点的半巢式 PCR 技术也被用于毛霉的鉴别，在发现无隔菌丝的 23 个组织标本中此方法检测出 13 例[88]。对该种分子生物学方法在 6 份毛霉菌的标本中进行了前瞻性评估，其中 5 例培养阳性[89-90]。提出基于细胞色素 B 基因位点的实时定量荧光 PCR 的方法；它允许利用熔解曲线分析区分不同属的毛霉菌(在 62 例福尔马林固定、石蜡包埋的组织样本中检测到 35 例)[91]。多靶点特异性定量 PCR 已被建立用于在福尔马林固定、石蜡包埋的人体组织中毛霉菌的检测[92]。多重 PCR 结合电喷雾电离用于直接检测阳性而培养阴性的未固定临床样本似乎有潜在的价值，可以进行种属鉴定[93]。

荧光染料标记的寡核苷酸直接杂交技术(原位荧光杂交)对于病理组织检测非常有用，因为它不需要 DNA 提取和 PCR 扩增，可在福尔马林固定、石蜡包埋的组织样本中使用。它采用针对不同真菌的 5.8 S 或者 18S RNA 的特异性荧光 DNA 探针，杂交后标记荧光的微生物可以直接在玻片上观察[94-95]。原位荧光可以提供额外的信息从而加强诊断。这种工具特别适合于 DNA 提取率低或核酸提取质量差的情况。事实上已发现 PCR 阴性，原位荧光杂交阳性的结果[95]。

(九)在血清样本中基于 PCR 的诊断：毛霉菌病的筛查

除了从组织标本中鉴定真菌的分子生物学方法，受曲霉高危患者筛选策略的启发，另外一种策略正在出现用于诊断毛霉菌病。最近的一项研究提出在毛霉病患病率比较高的人群中，用 PCR 连续检测血清样本中的毛霉菌基因如根霉属、毛霉属、根毛霉属和横梗霉属，作者使用这种方法能够在组织病理学或培养诊断前 3～68 天做出毛霉病的诊断[96]。在一项法国多中心研究对 44 名患者的回顾性分析中证实了这些发现。在治疗过程中与 qPCR 持续阳性的患者相比，qPCR 试验阴性的预后更好[97]。基于相同的 qPCR 分析，已经对具有高风险侵袭性伤口毛霉菌病(invasive wound mucormycosis，IWM)的烧伤患者测试了筛选策略。在对有或没有 IWM 的患者进行回顾性分析后，患者每周进行两次 PCR，一旦 PCR 阳性就对患者进行治疗。在两次 PCR 阴性结果后停止治疗。这种策略减轻了这种高风险人群的 IWM 负担，并改善了结果[23]。最近已经提出了具有不同设计的其他 PCR 检测方法，在血清、组织[98-99]或 BAL[100]中联合 2 种检测方法检测更广泛的毛霉菌。

所有的 qPCR 方法必须经过标准化，然后才

能作为一个用于侵袭性毛霉菌病的早期诊断的标准，并有可能用于高危患者的筛查。

(十)鉴定

1. 表型鉴定

(1)一般描述：表型鉴定主要是基于宏观和无性期微观的特征将毛霉菌鉴定到种，还有一些其他标准如生理实验[101]或最高生长温度可以使用。除非菌株同宗配合产孢，接合孢子的形成在常规鉴定中意义不大。利用含高碳水化合物的平板会产生丰富的菌丝，抑制无性孢子囊的产生，而后者有助于鉴别。因此，含有 2% 麦芽、马铃薯葡萄糖和樱桃汤(酸性)琼脂的平板被推荐用于大多数毛霉目真菌的培养。尽管有些平板并不是商业性的。为了促进孢子的形成，如新出现的病原体鳞质霉属或者瓶霉属[102-104]选择缺乏营养、含有低百分比酵母抽提液的平板为宜[105]。光和温度等多种因素也会影响该类真菌的生长、形态及孢子的形成。一些真菌具有耐热性，能够在超过 40 ℃ 的温度下生长。毛霉菌的菌丝体通常生长快速(24～48 h)和范围广。菌落形态会依据菌种、培养时间、使用的真菌培养基而发生变化。建议使用在 27～30 ℃ 生长的次代培养对毛霉菌进行准确的形态学研究。宏观检查包括菌落的特点(高度、颜色、纹理)和孢囊梗的空间分枝，可在 10 倍目镜或双目放大镜下观察。对于微观特征用胶带粘取菌落或者挑取菌落(少量菌丝加子实体放置在水滴中并用针轻挑)来观察产孢结构。毛霉特点：具有分枝、无隔、宽大，具有几丁质壁的菌丝(10～20 μm)。通过接合孢子进行有性繁殖，从相同的菌丝体(同宗配合)或从性分化菌丝体(异宗配合)交配后形成[106]。成熟的接合孢子通常是厚壁，并且在出芽前经历了一个必需的休眠期。无性繁殖是通过孢囊孢子(内孢子)，孢囊孢子从封闭囊样结构的孢子囊中生成。它们可以存在于多孢子的孢子囊或者有少量孢子(至少 1 个)的小型孢子囊中。孢子囊由孢囊梗支撑，有些真菌孢囊梗从一个假根的分枝菌丝上产生，假根将孢囊梗锚定在生长基质上，这些假根通过匍匐茎相连。另外的形态结构是囊轴(孢子囊的中心轴)和囊托(膨大的孢子囊梗就在囊轴的下方)。有些真菌可以产生厚壁和(或)薄壁肿胀结构，分别称为厚壁孢子和粉孢子。孢子囊壁破裂或溶解使孢囊孢子释放(图124-1)。常规用于毛霉目鉴定的结构包

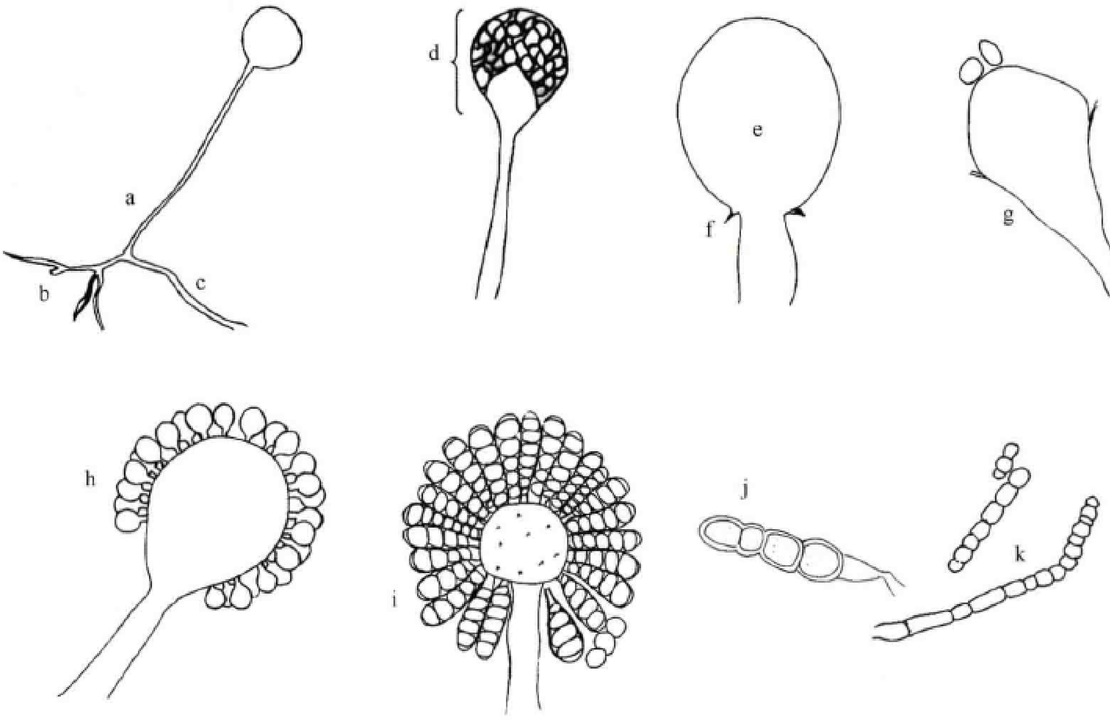


图 124-1 毛霉目形态结构示意图

注：孢囊梗(a)支撑包含孢囊孢子的孢子囊(d)，可以由假根(b)固定在培养基上，通过匍匐茎(c)扩展。囊轴(e)在孢囊梗的顶端产生，并在一些菌种中会出现囊托(g)。一些真菌的孢子囊释放孢子以后，可以看到薄壁的囊领(f)。仅有单个或几个孢子的孢子囊称为单孢子囊(h)，含有少量孢子成行排列的孢子囊称为柱形孢子囊(i)。可以观察到厚壁孢子(j)和粉孢子(薄壁肿泡)(k)。由 Dea Garcia-Hermoso 绘图

括孢囊梗分枝、孢子囊的种类(柱形孢子囊或小型孢子囊)、形状、颜色、存在或不存在的囊托和囊轴、有或无假根或厚壁孢子。

一些可能有用的网站如下：www. msgercdoctor-fungus. com；www. mycology. adelaide. edu. au；www. cbs. knaw. nl；http://www. mycobank. org。

(2)具体属和种的描述：引起人类感染的常见病原菌形态(宏观和微观)特征描述如下。根据笔者的经验和专业书籍中描述[14,20,107]只提及主要特征。所有菌落形态描述是在 MEA 平板(2% 麦芽琼脂)，30 ℃孵育(除非另有说明)的次代培养。毛霉目菌落大多质地为絮状，颜色从白色(瓶霉属)至黄色(毛霉属)、褐色(鳞质霉属)或灰色(横梗霉属，根毛霉属)。雅致放射毛霉(*Actinomucor elegan*)是个例外，呈羊毛状灰褐色的菌落。根霉产生高的气生菌丝，而根毛霉产生 2～3 μm 的低的气生菌丝。孢子梗的形态(高度、分枝)因菌属不同有所不同，如横梗霉属或毛霉属孢囊梗可以有分枝、根毛霉属和放射毛霉属有不规则分枝，根霉属无不分枝。此外孢囊梗产生的位置(假根之间或直接从匍匐茎)是用于鉴别不同属的补充线索(图 124-2)。毛霉目不同属形态见图 124-3。结合无性期子实体和最大生长温度可将这些真菌鉴定到种。以下描述的表型差异性是通过核酸序列分析确定的物种。

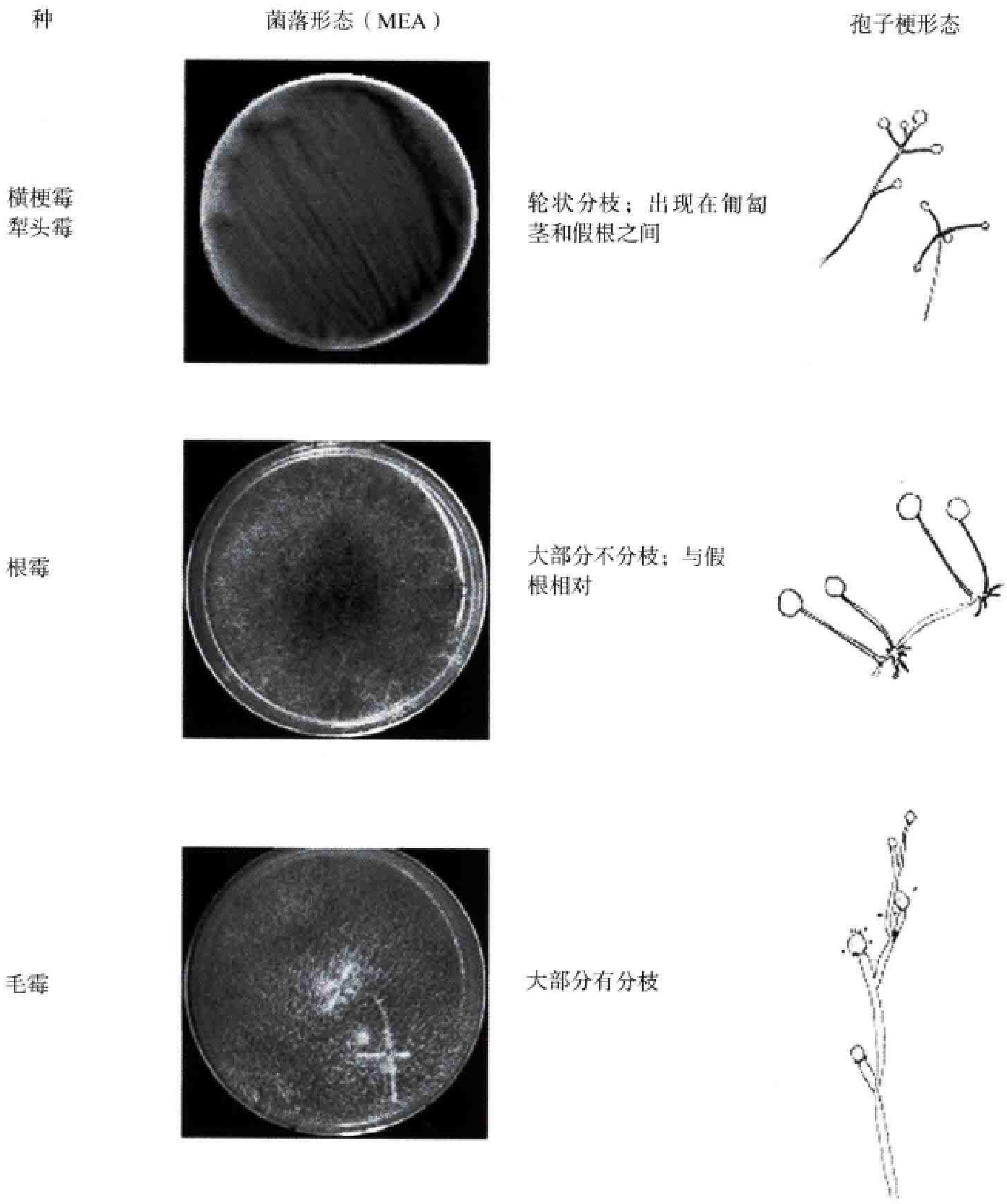


图 124-2　毛霉目部分属之间培养的差别及分枝结构，见彩插

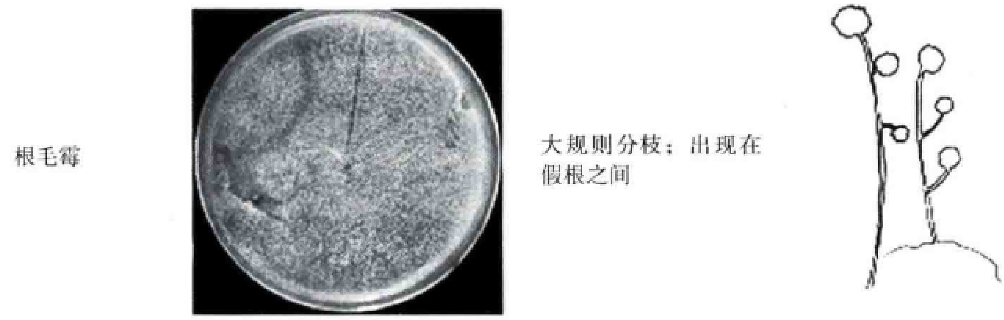


图 124-2(续)

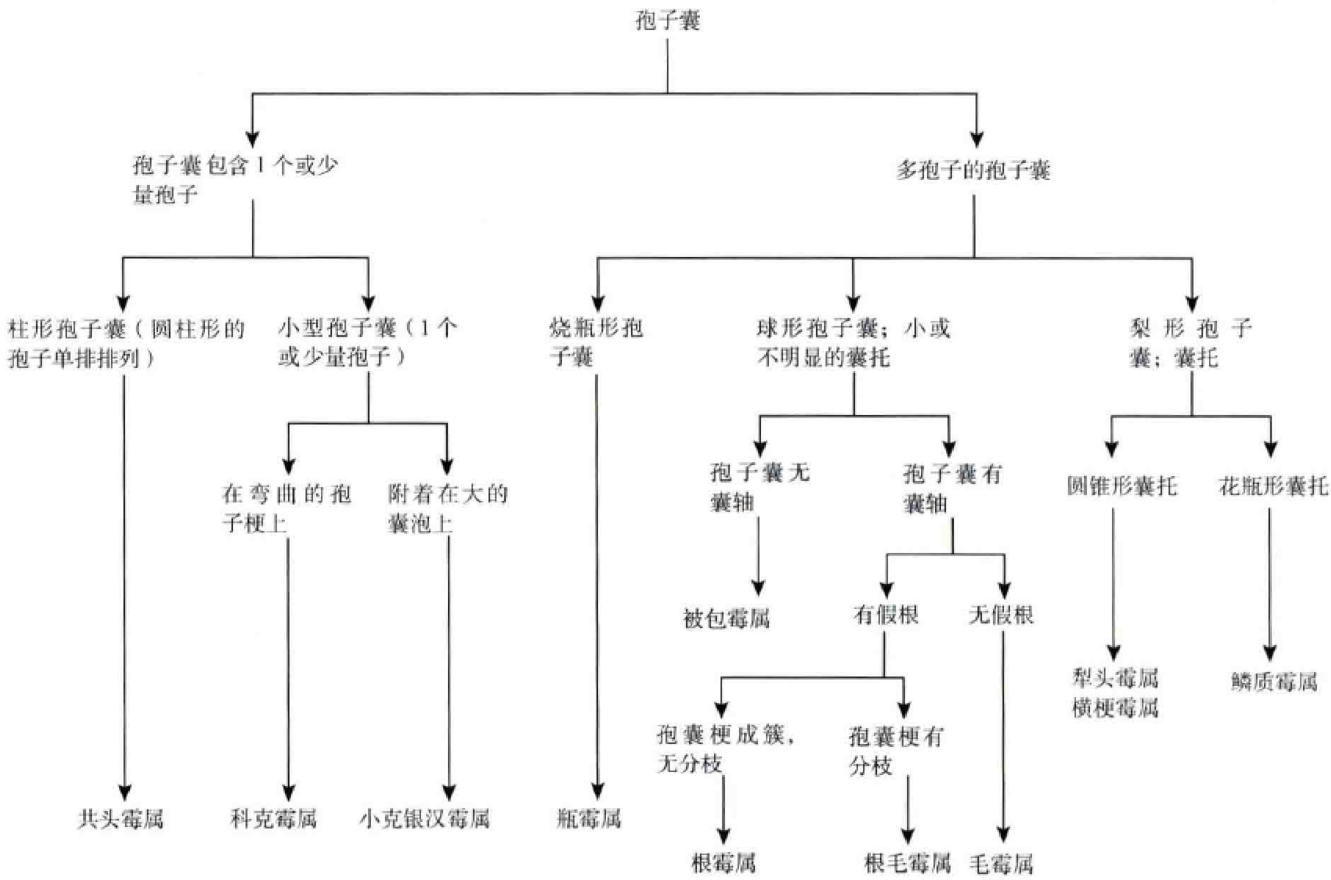


图 124-3 毛霉目不同属的鉴定流程图

1)横梗霉科：横梗霉属（Genus *Lichtheimia* Vuill. 1903，原犁头霉属或茎霉属）。已经根据系统进化、生理、形态特点对犁头霉属进行了修订[7]。耐热物种伞枝犁头霉、短刺犁头霉和透孢犁头霉归类于新的茎霉科和茎霉属。同一小组建议对命名法进行修正，创建新的横梗霉科（代替茎霉科），同时用横梗霉属代替茎霉属[108]。对38个在形态学上被鉴定为伞状横梗霉的菌株进行多基因序列分析，发现不同物种的存在[命名为分枝横梗霉]，该物种的形态和核苷酸序列与伞状横梗霉不同[6]。横梗霉属已知的5个菌种，只有伞状横梗霉、透孢横梗霉和分枝横梗霉与临床相关。这些菌种似乎在全世界均有分布，并且可以从不同的物质中分离出来，包括种子、土壤和腐烂的蔬菜碎片；它们产生白色、快速生长、毛茸茸的菌落，随着培养时间的延长变为灰褐色；最高生长温度为46～52℃。分枝横梗霉不同于伞状横梗霉和透孢横梗霉，在高温环境下生长更快速[8]。显微镜下孢囊梗通常是直立的且高度分枝、单独或者以伞状从匍匐茎伸出，而不是像根霉与假根方向相反，假根存在但一般不易辨认。多孢子囊小、球

形到梨形；囊轴半球形或椭圆形伴有锥形囊托；孢囊孢子光滑、透明、椭圆形、圆柱形或近球形(直径 2.73～2.24 μm)(图 124-4)；经常出现不规则形状的巨型细胞。尽管在以前的报道中孢囊孢子长度、宽度和长/宽比存在显著差异，3 种病原菌的孢囊梗和孢囊孢子的形态非常相似[45]。

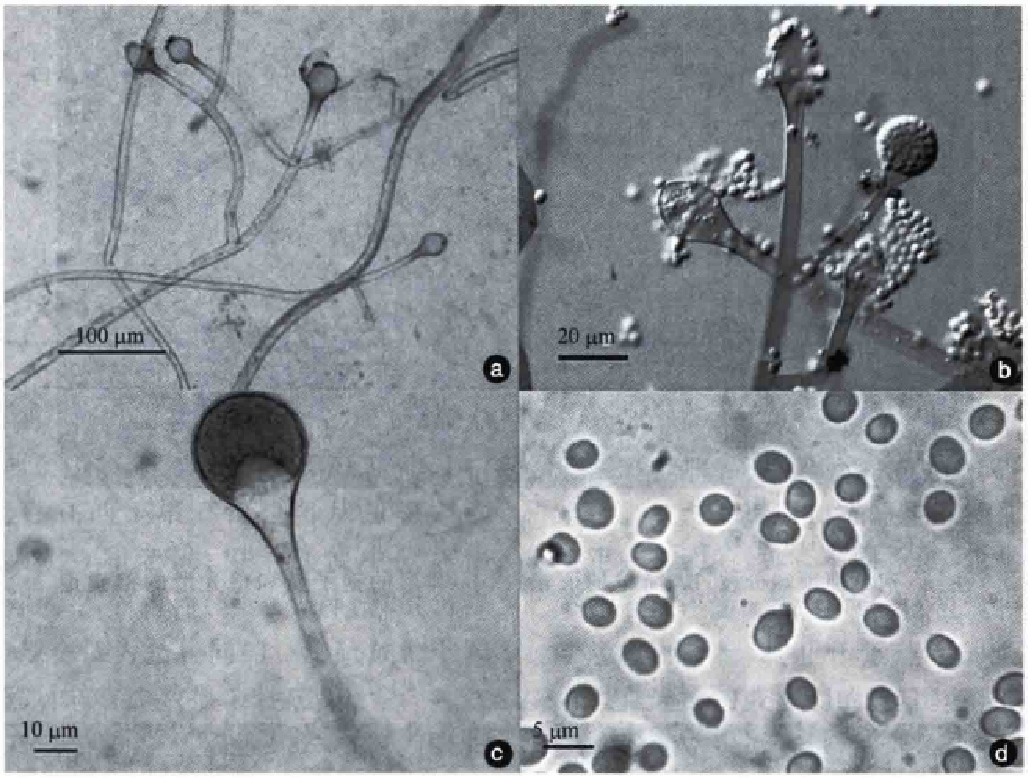


图 124-4 伞状横梗霉

注：a. 分枝的孢子梗；b. 半球形的囊轴和孢囊孢子；c. 梨形的多孢子孢子囊和明显的锥形囊托；d. 孢囊孢子，见彩插

根毛霉属(Genus *Rhizomucor Lucet* & Costantin 1900)。微小根毛霉和米黑根毛霉是根毛霉属中的致病菌。根毛霉属的菌株最常从堆肥或者发酵的有机物中分离[109]。宏观上根毛霉迅速生长形成灰色(米黑根毛霉)至棕色的羊毛状菌落(微小根毛霉)；孢囊梗单一或分枝，从气生菌丝或匍匐茎伸出；假根存在但往往难以识别；孢子囊是多孢子孢子囊，无囊托；大多数菌是耐热的；孢囊孢子圆形、透明、壁光滑(图 124-5)。2 种菌可通过孢子囊的大小、蔗糖同化、硫胺素存在的生长能力进行鉴定。米黑根毛霉与微小根毛霉相比具有较小的孢子(直径 60～100 μm)，不能同化蔗糖，其生长取决于硫胺素的存在。

2)毛霉科：毛霉属(Genus *Mucor* Fresen. 1850)。有 4 种人类致病菌：卷枝毛霉、不规则毛霉(以前称为多变根毛霉多变变种)、印度毛霉和多分枝毛霉[10,110]。

毛霉属菌落通常快速生长、白色到黄色，随着时间的推移颜色变为灰色。高大的孢囊梗单个或者有分枝(可高达几厘米)，支撑含有大量孢子的孢子囊；孢囊孢子是透明的，圆形至椭圆形。有些真菌可以看到孢子囊壁(囊领)残留，有些可以产生假根和厚壁孢子(图 124-6)。

卷枝毛霉是一种复杂的物种包含 4 个变种，主要是根据囊轴和孢囊孢子的形态不同。表 124-2 总结了参与人类感染的耐热菌种的主要表型差异。致病菌种的最高生长温度范围 35(卷枝毛霉)～42 ℃(印度毛霉)。在不适合的环境中生长会造成形态的变化如不育的孢子囊，孢子囊肿胀和孢子囊、囊轴、孢囊孢子大小的改变，从而造成鉴定的困难[111]。

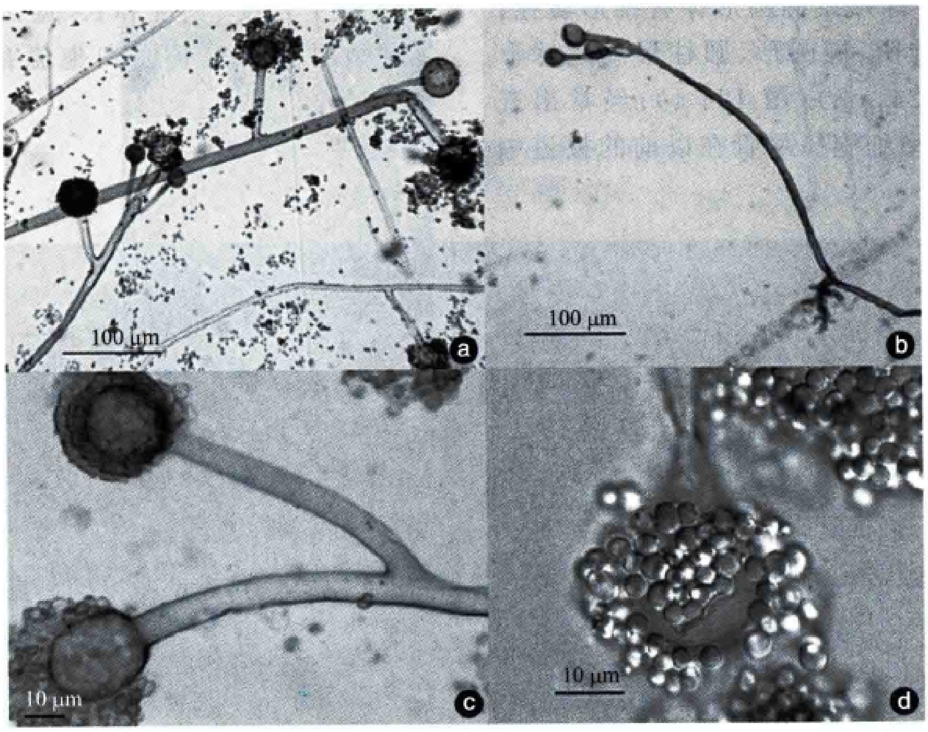


图 124-5 微小根毛霉
注：a. 孢囊梗顶端分枝；b. 简单的假根；c，d. 圆形的孢子囊和壁光滑的孢囊孢子，见彩插

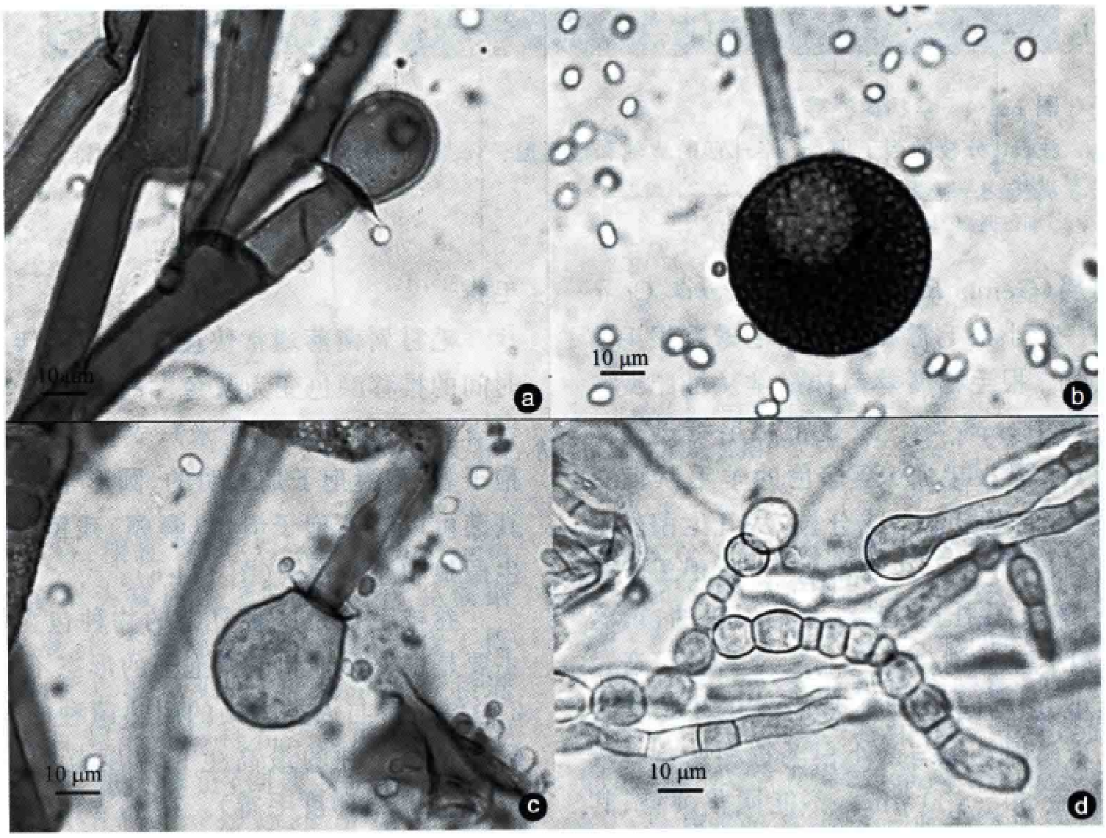


图 124-6 卷枝毛霉的微观形态
注：a. 孢囊梗；b. 孢子囊；b，c. 椭圆形的孢囊孢子；d. 粉孢子，见彩插

表 124-2　引起人类感染的毛霉菌属真菌的宏观和微观特征

种	菌落形态：高度	孢囊梗	孢子囊（直径）	囊轴（形态）	孢囊孢子（形态）	最高生长温度(℃)	厚壁孢子	其他特征
卷枝毛霉	浅灰至棕色；最高 6 mm	多重分枝	最高 80 μm	倒卵球形至椭圆形	椭圆形	36～40	罕见	同化乙醇
M. velutinosus	白色至浅灰色，最高 2 mm	合轴分枝	最高 60 μm	球形至圆锥形	有疣，球形至近球形	38	丰富	有假根
不规则毛霉（原名多变根毛霉多变变种）	白色至浅黄色；最高 2 mm	简单或单次分枝	最高 100 μm	不规则	可变	38	丰富	有假根
多分枝毛霉	橄榄灰；最高 2 mm	蓬大	最高 80 μm，短的侧边分枝	扁平	光滑，近球形至椭圆形	36	无	基底菌丝有粉孢子
印度毛霉	深黄色；最高 10 mm	多重分枝	最高 75 μm	近球形	近球形至圆柱-椭圆形	42	丰富	孢子生成依赖光

放射毛霉属（Genus *Actinomucor* Schostak. 1898）。雅致放射毛霉是放射毛霉属唯一的一个种。这种普遍存在的土壤真菌也可从植物根部（燕麦、大麦、小麦）和老鼠、兔子粪便中分离出来[112]。该菌种的 3 个病种（雅致变种、科威特变种、台湾变种）现在认为是相同的。雅致放射毛霉是一种新的病原体，有少数播散性感染[113-115]和浅表感染[116-117]报道。该物种用于一种在越南和中国流行的奶酪状大豆制品（腐乳）的发酵[118-119]。从宏观上看，在 30 ℃下培养 7 天后，菌落呈絮状，白色至奶油色。老的菌落会变成羊毛状的棕色-米色。放射毛霉属独特的显微特征有助于形态学鉴定。透明的，具有不同长度，轮生分枝的孢囊梗终止于孢子囊。轮生的分枝包囊梗可产生次生孢子囊或再分枝，终止于近球形的囊轴。孢子囊壁可以是光滑的或多刺的，包围着直径为 5～10 μm 的球形到卵球形孢子囊孢子。有假根和厚壁孢子的存在（图 124-7）。

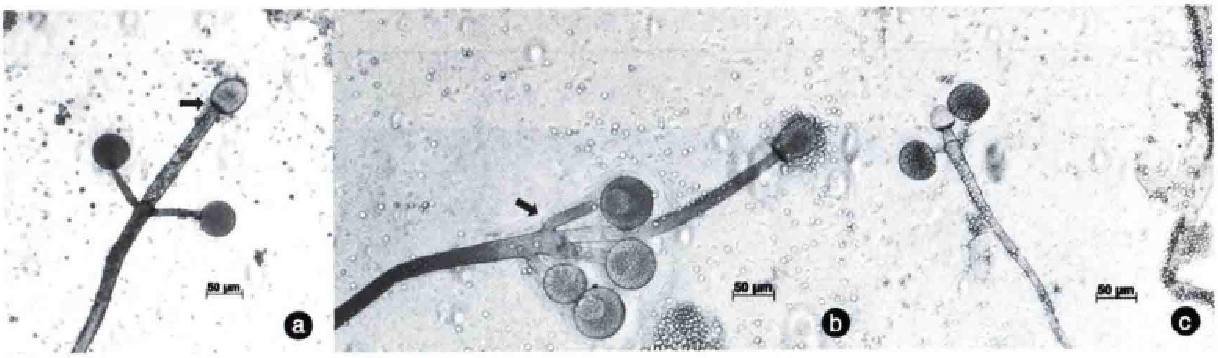


图 124-7　雅致放射毛霉

注：a. 分枝的孢囊梗，近球形囊轴（箭头）；b. 具次生孢子囊的分枝、轮生孢囊梗（箭头）；c. 轮生分枝孢囊梗，见彩插

科克霉属（Genus Cokeromyces Shanor 1950）。屈弯科克霉是一种罕见的毛霉目真菌，主要从北美洲（美国和墨西哥）的土壤、兔子、老鼠或者蜥蜴的粪便中分离到。菌落生长缓慢（高度<1 mm），灰色到褐色；显微镜下特征包括：从不分枝的孢囊梗末端顶囊产生长的、下弯的、扭曲的茎，末端为球形的孢子囊（直径 8～11 μm）；孢囊孢子光滑、大小为 2～4 μm（图 124-8）；通过如脑心浸液或酵母膏蛋白胨琼脂平板的次代培养可形成酵母样形态。酵母样形态是薄壁至厚壁、球形，直径为 10～100 μm。一些细胞在它们整个表面产生单芽，外观与船舶轮相似，这点类似巴西副球孢子菌[20]。该菌同宗配合产生柠檬形接合孢子。

3）瓶霉科：鳞质霉属（Genus *Apophysomyces*

P. C. Misra 1979)。鳞质霉属成员是分布在热带、亚热带地区的土壤真菌;它们快速生长形成白色至灰色的菌落;总的特点是直立的孢囊梗,无分枝且单个存在;含有多孢子的孢子囊通常梨形,直径20～60 μm;囊轴半球形、圆柱形、梯形或椭圆形;孢囊梗壁光滑;花瓶状、钟状或漏斗状的囊托是这个菌属的一个鲜明特征(图 124-9)。最适生长温度 42 ℃[107];应用营养缺乏的培养基(水-酵母提取物培养基)可提高产孢量,而在原代分离培养基上缺乏[105]。直到最近,雅致鳞质霉仍是鳞质霉属唯一一个种。Alvarez 和他的同事[9]通过分子多样性研究发现鳞质霉属另外 3 个种(多变鳞质霉、梯形鳞质霉和骨状鳞质霉),这也是基于形态学、生理学和系统发育的差异。

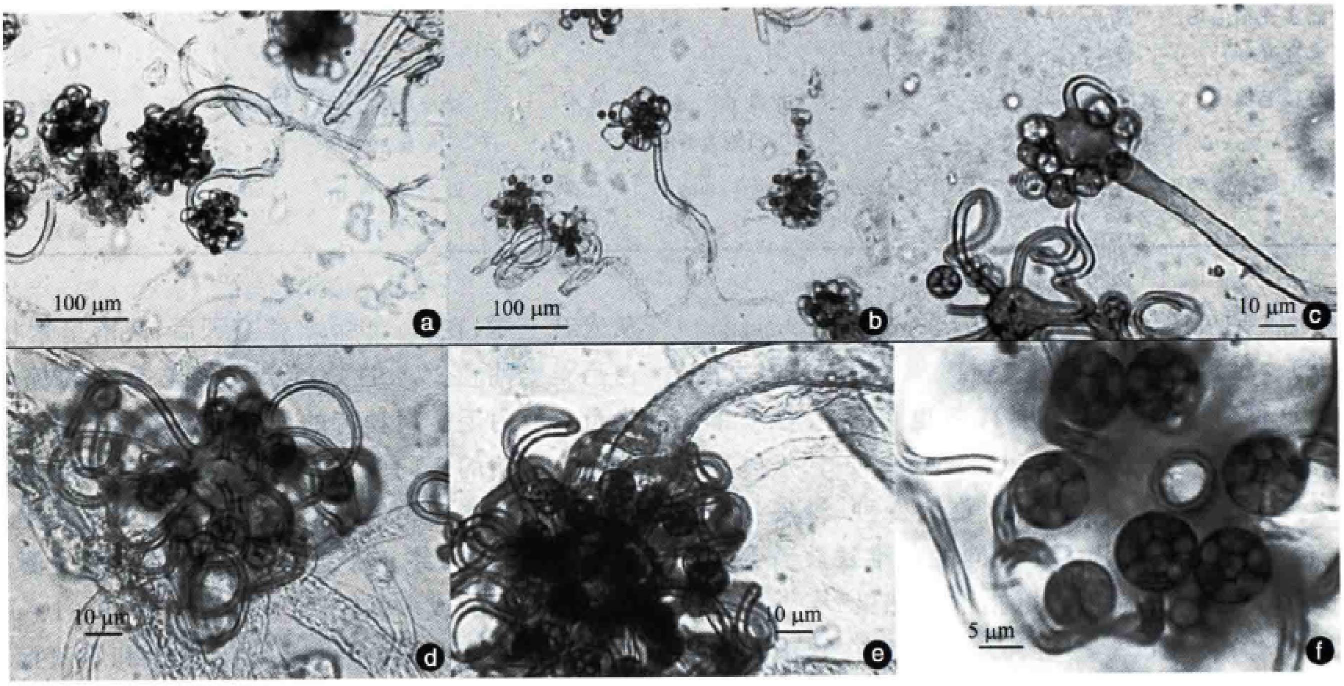


图 124-8 屈弯科克霉

注:a,b. 大部分孢囊梗无分枝、无假根;c. 未成熟的孢子囊;d～f. 从终端顶囊长出的弯曲的茎和含有少量孢子单孢子囊,见彩插

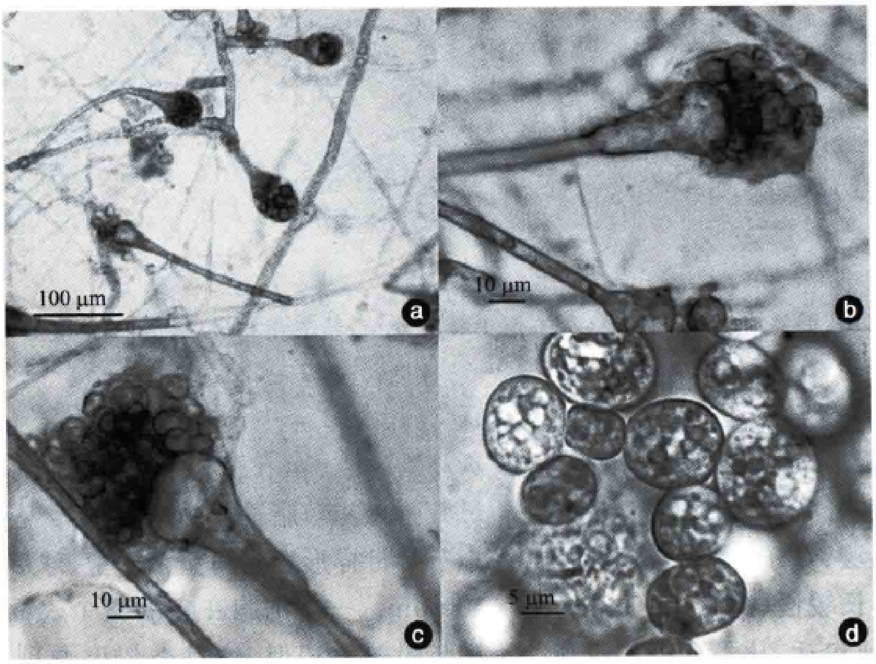


图 124-9 雅致鳞质霉

a～c. 不分枝的孢囊梗支撑伴有花瓶状囊托的多孢子孢子囊;d. 圆柱形的孢囊孢子,见彩插

瓶霉属(Genus *Saksenaea* S. B. Saksena 1953)。瓶霉属被认为是一个复杂的物种。长期以来认为 *S. vasiformis* 是该属的唯一菌种。Alvarez 等[120]描述了除 *S. vasiformis* 之外的2个新菌种红孢瓶霉和椭孢瓶霉。该菌属为腐生真菌,在世界范围分布,其首次被 Saksena[16]从森林的土壤中分离。菌落呈灰白色,最高生长温度 44 ℃。Padhye 与 Ajello[105]建议使用特定的低营养培养基(水-酵母提取物培养基)可诱导产孢。察氏培养基在 30 ℃或 37 ℃也可诱导产孢。显微镜下孢囊梗不分枝,有暗色的假根。孢囊梗与孢子囊的长度、孢囊孢子的大小与形状及最高生长温度,这些特征可用于区分不同菌种。图 124-10 显示了独特的瓶形的多孢子孢子囊,是鉴定该属的关键特征。

4)跟足科:根霉属(Genus *Rhizopus* Ehrenb. 1821)。少根根霉(原名米根霉)和小孢根霉是最常见的病原菌种类。本属真菌广泛存在于空气、土壤、堆肥中,特点是快速形成白色絮状菌落,由于有色的孢囊梗和孢子囊的存在,菌落变成褐色到黑色;表 124-3 列出了区分根霉属不同种的特征。孢囊梗无分枝、单个或成簇产生,在基底部有发达的假根,可以将根霉属与横梗霉属和根毛霉属区别。

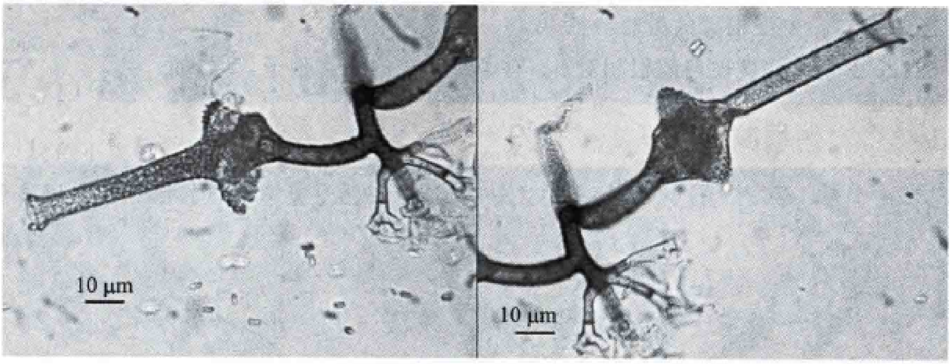


图 124-10 *Saksenaea vasiformis* 无分枝孢囊梗,深色的假根和典型的瓶形的多孢子孢子囊,见彩插

表 124-3 根霉菌主要的鉴别要点

菌名	孢子梗	孢子囊(形状和纹路)	生长温度				
			30 ℃	37 ℃	40 ℃	45 ℃	50 ℃
少根根霉(原名米根霉)	通常高于 1 mm	有棱角,圆形至椭圆形;有条纹	+	+	+	阴性	阴性
匍枝根霉			+	阴性	阴性	阴性	阴性
小孢根霉小孢变种	不超过 0.8 mm	有棱角,卵圆形;有条纹	+	+	+	+	阴性
小孢根霉寡孢变种		大圆形;不规则的条纹	+	+	+	有限的生长	阴性
小孢根霉跟足变种		小圆形;具微刺	+	+	+	+	+
小孢根霉中国变种		有棱角的,均匀	+	+	+	+ 不成熟的孢子囊	阴性
小孢根霉 *azygosporus* 变种		球形;几乎没有条纹	+	+	+	+	+
希泊拉根霉菌		球形至卵圆形;有条纹	+	+	+	非常有限的生长	阴性

少根根霉微观特征包括单一或成簇的棕色孢囊梗,高度 1~2 mm,支撑多孢子孢子囊(直径 150~170 μm);囊轴是椭圆形、灰褐色;大多囊轴基底部平截;假根发达很容易在立体显微镜下观察到;孢囊孢子有棱、圆形至椭圆形,纵嵴大小为(6~8)μm×(4.5~5.0)μm,可以见到厚壁孢子(直径 10~35 μm)(图 124-11);可以在 40 ℃生长,而在 45 ℃不生长。少根根霉不同于非致病的匍枝根霉(*R. stolonifer*),后者具有更长的孢子梗(>2 mm)和更大的囊轴(直径达 275 μm),在 40 ℃不生长[121]。

根据最近一项美国流行病学调查显示小孢根霉是毛霉病中第二常见的病原菌[122];它可以从土壤或木制品中分离出来;菌落浅棕灰色,孢子梗从

匍匐茎长出，长达 400 μm[123]。孢子深褐色(直径最大 80μm)；囊轴圆锥形；孢囊孢子有棱、椭圆形(图 124-12)。除了典型的小孢根霉小孢变种，还有 3 个变种：小孢根霉中国变种、小孢根霉寡孢变种、小孢根霉跟足变种，它们可以通过孢子囊基本形状和温度耐受性进行区分。在变种之间观察到的差异性在遗传学上并不支持[124]。表 124-3 显示根霉属菌种之间的主要差异。

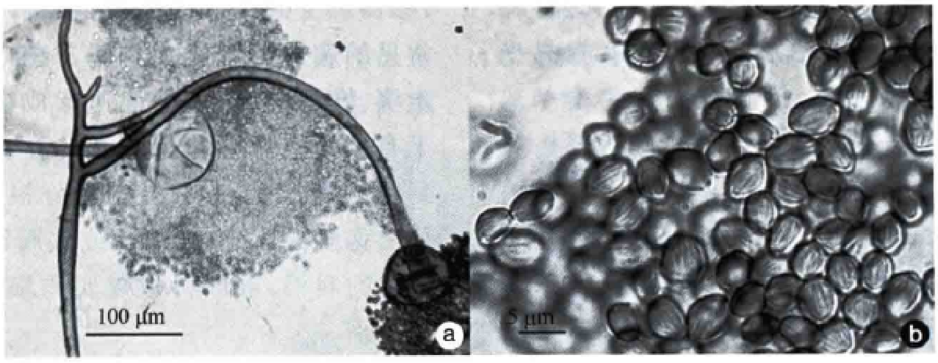


图 124-11 少根根霉的微观特征

注：a. 深色的孢囊梗与假根相对；b. 有条纹和棱的孢囊孢子，见彩插

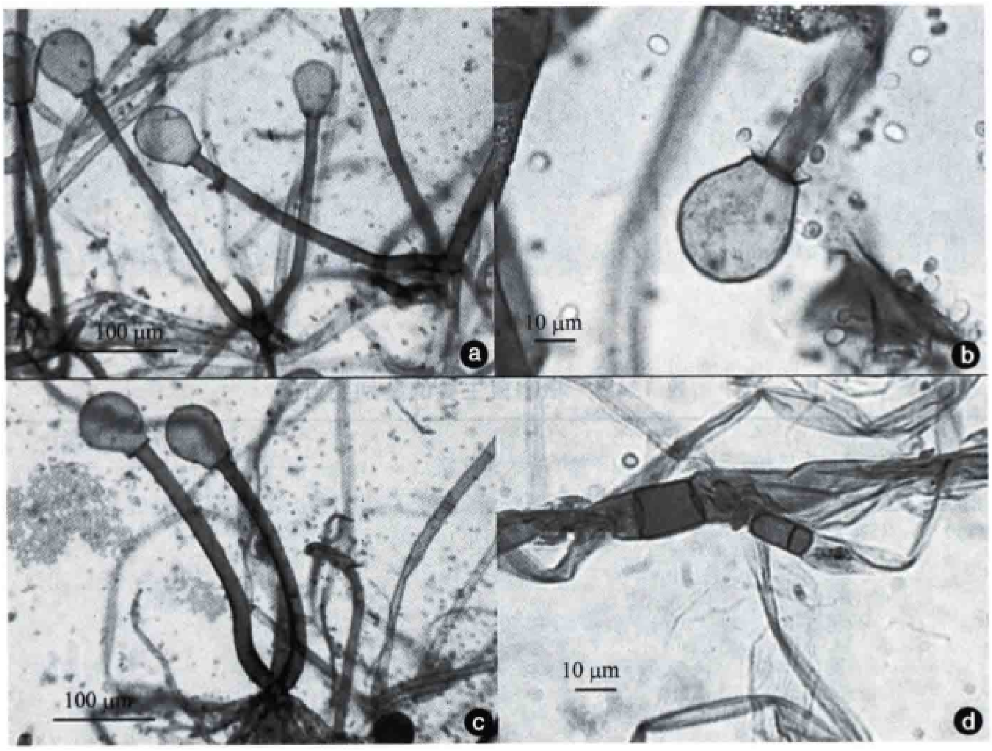


图 124-12 小孢根霉的孢囊梗较短、有颜色且常成对出现

注：a，c. 假根；b. 圆锥形的囊轴；d. 厚壁孢子，见彩插

5)小克银汉霉科(*Cunninghamella*：Genus Cunninghamella Matr. 1903)。传统上认为灰色小克银汉霉是唯一与临床相关的种属。虽然灰色小克银汉霉较少引起感染，但是其具有感染免疫功能正常人的能力。其他如雅致小克银汉霉、刺孢小克银汉霉[125]、短刺小克银汉霉[126]也与人类毛霉病感染有关。灰色小克银汉霉是耐热真菌，可从土壤中分离；它会产生白色到深灰色扩展的菌落；孢囊梗直立，在顶端区域有侧向分枝。每个分枝产生的球状顶囊(直径达 40 μm)，产生具有 1 个孢子的单孢子囊。在成熟期每个单孢子囊将产生细棘刺球形孢囊孢子(直径 7～11 μm)(图 124-13)。灰色小克银汉霉的鉴定关键是 45 ℃生长(最高 50 ℃)，在顶囊末段形成单孢子的单孢子囊。

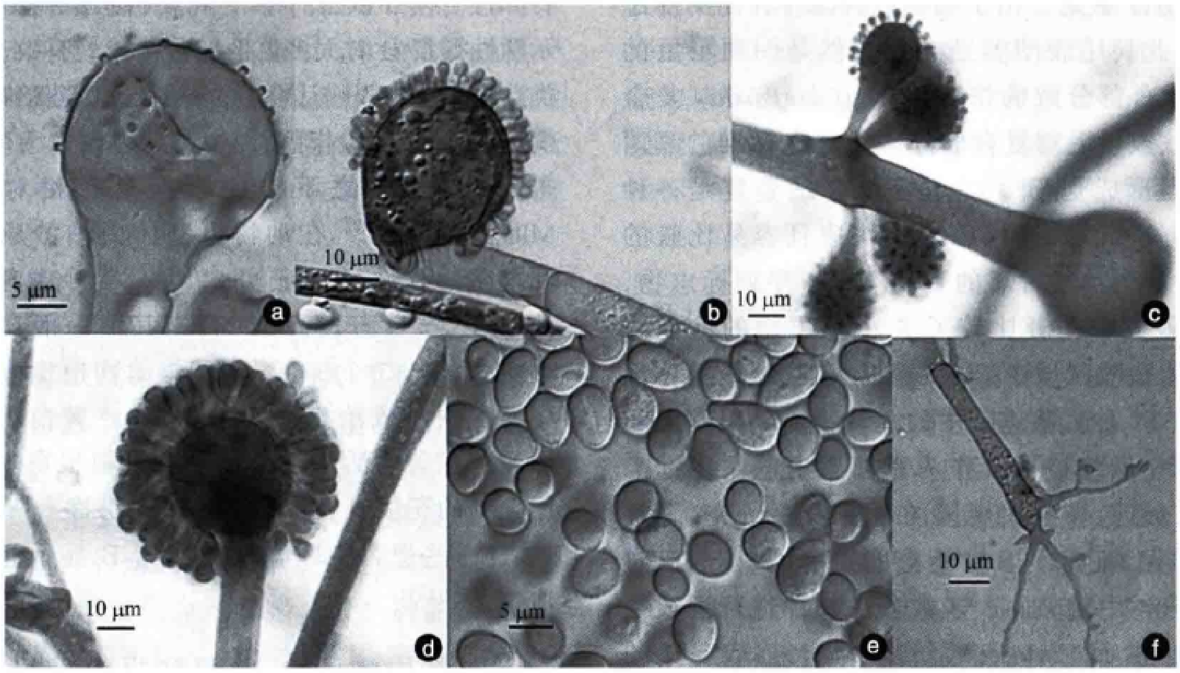


图 124-13 灰色小克银汉霉

注：a、b、d. 球形顶囊表面具有单层孢子的孢子囊；c. 较多的顶端分枝；e. 成熟的单孢子囊产生单一的有棘刺的孢囊孢子；f. 假根，见彩插

6）共头霉科（Syncephalastraceae）：共头霉属（Genus *Syncephalastrum* J. Schröt. 1886）。共头霉属菌种分布在世界各地，可从土壤、植物和多种食物中分离出来[16]。唯一与人类感染相关的菌种是总状共头霉，对其描述如下。

总状共头霉生长迅速，形成白色至浅灰色的菌落，随着孢子囊的形成逐渐变为黑色，这和根霉属相似；最高生长温度是 40 ℃；孢囊梗短、直立、多数有分枝；产生假根；形成终端球状顶囊。这些顶囊的整个表面覆盖圆柱形的柱形孢子囊，包含（3～14 个）壁光滑、球形至卵形的柱形孢子，单排排列（图 124-14）。这是区别于其他毛霉目成员的一个鲜明特征。

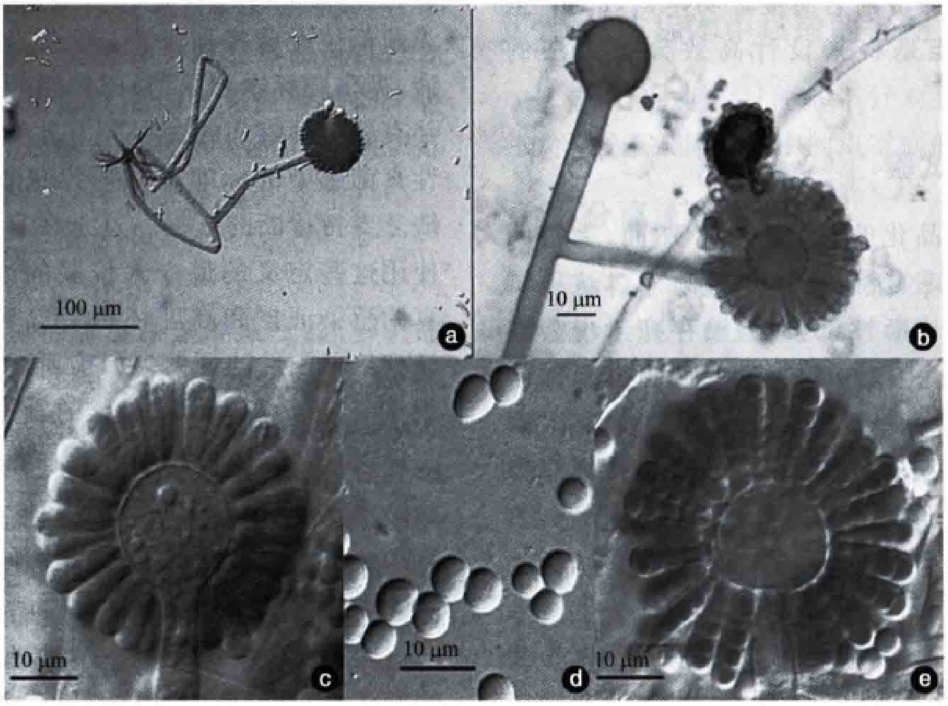


图 124-14 a. 从假根产生的短孢子囊梗；b、c、e. 终端顶囊被柱形的孢子囊覆盖；d. 总状共头霉特征性的柱形孢子，见彩插

2. 分子鉴定 由于毛霉目真菌有共同的形态特点，因此利用表型鉴别它们仍然是一项艰巨的任务。此外部分致病物种，如 *S. vasiformis* 复合群和雅致放射毛霉复合群经常无法在标准的真菌培养基上形成孢子[127]。基于测序的鉴定是一种有用的方法，因为它可以提供快速且容易比较的数据[128]。为寻找可靠的真菌 DNA 序列标志物，Schoch 及其合作者比较了 6 个标志物的性能：3 个核糖体核酸区域（ITS、核糖体大亚基、核糖体小亚基）和 17 种真菌谱系中的 3 种蛋白编码基因的部分，ITS 最终被提议作为真菌鉴定的主要标志物[129]。最近，一项大规模的系统发育研究（超过 650 多株菌）证实 ITS 对毛霉鉴定有用，目前已对形态学分类中定义的大多数公认物种进行了很好的区分。然而，Balajee 等[130]在 2009 年定义的 99%鉴定阈值并未涵盖测试用临床重要毛霉目菌的种内变异性[124]，需要进一步的系统发育研究来划定物种界限，并分析物种内和物种间的变异，以确定一个新的识别阈值，为这些生物建立一个可靠的基于 ITS 的鉴定。

(十一)分型系统

根据定义，分型方法被发展用来研究给定菌株（环境或临床分离株）的多样性和相关性。对临床分离的毛霉菌进行分型的方法很少[27,131-132]。这些方法由于其低鉴别力而被证明是低效的。全基因组测序可能是将来设计高效分型方法的关键[102]。

(十二)血清学试验

目前没有商品化的检测分析。然而，毛霉菌抗原可用于检测毛霉特异性 T 细胞[133]。这项试验被认为是一项诊断性试验，检测存在于侵袭性毛霉菌病患者（$n=3$）而不存在于其他类型感染（$n=17$）或无感染（$n=8$）患者的毛霉特异性 T 细胞。这些 T 细胞在发病时和发病过程中都可以检测到，但在发病前检测不到。

(十三)抗菌药物敏感性试验

体外抗菌药物敏感性可以通过 CLSI[134] 和 EUCAST[135] 提供的微量肉汤稀释法进行评估或者使用商品化的试剂（Etest）[136]。虽然毛霉目对大部分抗菌药物的敏感性相同，但属甚至种仍然具有一定的特异性。体外试验[83,137-141]和动物感染模型[142-146]显示两性霉素 B 对大多数毛霉目菌株最有效。新的唑类药物中伏立康唑活性差，在用伏立康唑治疗的毛霉病患者[147]及实验模型[148]中突出表现为突破性的毛霉菌病。相比之下泊沙康唑具有相对较低的 MIC[83,138-139,146,149]，在动物模型体内泊沙康唑治疗和预防的疗效已被证实[150-151]。艾沙康唑相比泊沙康唑[152]具有较高的 MIC，其值一般比泊沙康唑[153]高 1～3 个梯度。然而，动物模型表明艾沙康唑在预防或治疗是有效的[154]。棘白菌素在体外没有显著的活性[155-156]，尽管少根根霉具有这类化合物的靶酶。在体内单用卡泊芬净[63]有些许疗效，在一些患者中联合两性霉素 B 显示有较好的临床疗效[111]。

(十四)结果的评价、解释和报告

培养的结果应该按照临床表现与直接检查和（或）组织病理学检查的结果进行解释。毛霉目真菌培养阳性可能是由于标本采集或者实验室处理过程中的污染。西班牙的一项研究表明，实验室培养出的毛霉菌中只有不到 8% 是分离自侵袭性毛霉病的患者[35,157]。EORTC/ MSG 研究组对诊断侵袭性真菌感染的修订定义中，确诊病例要求“经针穿刺或活检标本组织病理学、细胞病理学或直接镜检显示菌丝伴随着相关组织损伤的证据”或者“从标本中培养分离出霉菌；标本是从正常的无菌部位无菌操作采集，不包括支气管肺泡灌洗液、鼻窦腔标本和尿；临床和影像显示异常的部位伴有感染性疾病的过程”[158]。然而，“不符合侵入性真菌感染的标准也并不意味着没有感染，只是缺乏支持诊断的证据。这是在日常临床实践中不使用这些定义的最令人信服的原因”。有侵袭性真菌感染证据和高度怀疑毛霉病的患者，可能会缺少培养阳性的证据。如前所述建立明确的诊断很重要，可为患者提供最佳的管理。

三、虫霉病

(一)流行病学和传播

虫霉病大部分成员是节肢动物和其他动物的病原体。它们存在于土壤、腐烂的蔬菜和粪便中，在世界范围内广泛分布，在非洲和亚洲温暖的气候中分布更广[20]。在亚洲（第 1 例报道的印度尼

西亚、印度和缅甸)及几个非洲国家(主要是乌干达和尼日利亚)报道过蛙粪霉引起的感染,却很少出现在南美洲。蛙粪霉最近在美国引起胃肠道症状[159]。耳霉属引发感染的病例在非洲、马达加斯加、印度、中国、马约特岛、日本和美国南部均有报道[160-162]。

(二)临床表现

毛霉病和虫霉病的一个主要区别是:前者主要发生在易感个体,后者大多发生在免疫功能正常的宿主。

蛙粪霉主要引起皮下感染,常累及四肢、臀部、躯干和会阴,而面部和颈部少见。本病好发于男性儿童,临床表现为木质感、坚硬、肿胀、无痛性结节,向周边扩大,不影响表层皮肤[163]。成人[159,164]和儿童[165]胃肠道感染的散发性侵袭性感染在全世界都有报道。值得注意的是,在亚利桑那州[166]也有一个小的患病聚落报道,这种表现可能类似于恶性肿瘤[167-169]。播散性感染是极其罕见的[170]。

与蛙粪霉病相比,虫霉属引发的感染主要发生于成年人(主要是男性)和户外工作者;常常局限于鼻子和脸;最初的感染发生在鼻黏膜轻微创伤孢子附着,随后肿胀扩展到鼻子、鼻唇沟、脸颊、眉毛、上唇甚至腭咽,严重时产生特征性面容[171]。现在提出了一种临床分期系统,分为非典型、早期、中期和晚期[172]。此真菌导致结膜感染在巴西有一次报道[173]。播散性病例在免疫抑制的个体中很少报道[174]。冠状耳霉菌和异孢耳霉菌引起组织病变是相似的[175]。

(三)治疗和结果

由于这些罕见的感染缺乏临床试验,蛙粪霉病和虫霉病的治疗策略没有标准化。手术切除、碘化钾和长期唑类治疗已被成功用于蛙粪霉属感染的治疗[29,160]。对于虫霉属感染,碘化钾使用效果不确定;现在长期的口服唑类应该被应用,并且是成功的[161]。最近,伊曲康唑和碘化钾的联合治疗取得了令人鼓舞的结果,10 例患者中有 7 例对联合治疗有反应,其中 5 例患者完全缓解[176]。

(四)标本的采集、运输和储存

由于可能会出现多种鉴别诊断,因此,应确认真菌病原体;其中感染部位的组织活检标本是最好的诊断标本。诊断依赖于未固定样本的直接检查与培养和(或)固定样本的组织学检查联合的经典程序。胃肠型的蛙粪霉病胃镜检查中获得的活检标本是金标准;标本应立即处理,而且不应该冷藏[163]。

(五)直接检查

将组织标本用 KOH 消化、荧光增白剂染色后可以对新鲜的标本进行直接检查。对于组织学可以进行经典的染色,包括 HE 染色、过碘酸-雪夫和 Grocott-Gomori 改良六胺银染色法。通常情况下,菌丝相比毛霉菌更宽大、壁更薄,更多分隔;急性与慢性炎性反应在受感染组织中可观察到;菌丝可以通过常规染色方法观察到。根据存在有 Splendore-Hoeppli 反应并在组织切片 HE 染色中观察到典型的菌丝就可以建议是虫霉病。粉红色结构对应菌丝片段周边无定形的嗜酸性物质。尽管存在 Splendore-Hoeppli 现象高度提示虫霉病,但在多种细菌、真菌、寄生虫感染及非感染性疾病均可看到[177]。与毛霉病相反,通常无坏死和血管侵犯。

(六)抗原检测

目前没有可用于虫霉病的抗原检测。

(七)临床标本中核酸的检测

已经开发出一种基于针对蛙粪霉属的 PCR 技术,用于人体标本中的虫霉病的诊断[178]。

(八)分离流程

活检标本应切片或切碎(不能研磨),然后接种在沙保弱平板或 PDA 平板。由于抑制蛙粪霉属和耳霉属的生长应避免使用含有放线菌酮的平板;培养必须在 37 ℃和 25～30 ℃同时进行,因为此类菌种具有不同的最佳生长温度。蛙粪霉属在 30 ℃生长良好,但在 37 ℃ 生长较慢,而耳霉属在 37 ℃生长迅速[16]。

(九)鉴定

1. 表型鉴定　虫霉门成员的特点是:多核或短小的菌丝体;存在初生和次生分生孢子,孢子在成熟的时候会被主动射出。初生孢子具有乳突状

的基底，直接从菌体上循环产生[14]。在适宜的条件下，初生分生孢子产生一个芽管或可以产生较小的次生分生孢子(形态类似初生分生孢子)，也可以发展成柔毛孢子(老的分生孢子具有毛状附着物)。也可能出现小分生孢子的被动释放。在一些物种中，薄的孢囊梗会在其顶端生成毛状孢子，这些孢子的特点是顶端具有黏着性。接合孢子(厚、双层、有壁孢子)在未分化的配子体接合后产生，喙状突起来自于残留的配子囊[14,20,107]。培养3～10天后产生孢子。菌落通常蜡样或粉末状的，有放射状的褶皱，颜色从白色到棕色[14,20]。该类真菌的关键特征是它们能主动释放分生孢子。因此，在培养皿上放置一张盖玻片有助于乳头状分生孢子的收集。有关详细说明和附加信息，参见 Ben-Ze'ev 和 Kenneth 的[179]分类学研究。

虫霉纲

(1)虫霉目、新月霉科：耳霉属(Genus *Conidiobolus* Bref. 1884)。耳霉属物种是包括腐生生物、兼性无脊椎动物、脊椎动物的病原体[13]。引起人类感染的3种病原菌是冠状耳霉菌、异孢耳霉菌和闪光耳霉菌。

冠状耳霉菌是一种快速生长的真菌，存在于土壤和腐烂的叶子中[107]。它最常见于非洲的热带森林[180]。冠状耳霉偶尔是昆虫的病原体，并已从不同的动物如海豚、黑猩猩和马等多种动物中分离到[16]。

菌落是透明的、放射状褶皱，最初呈现蜡状，当菌丝体可见的时候转变成粉末状。培养皿的盖子会覆盖一层由分生孢子梗释放出来的分生孢子。初生分生孢子球形(直径 40 μm)，有突出的乳突。柔毛孢子会出现在老的菌落中(图 124-15)。重复被动排出的小分生孢子有规律的产生[14]。冠状耳霉菌可以通过在 PDA 培养基上不能产生接合孢子和柔毛孢子的出现与其他2种致病菌进行鉴别。同样，异孢耳霉菌产生接合孢子，可以通过大小及成熟接合孢子内的小球的形成与闪光耳霉菌等进行鉴别[181]。

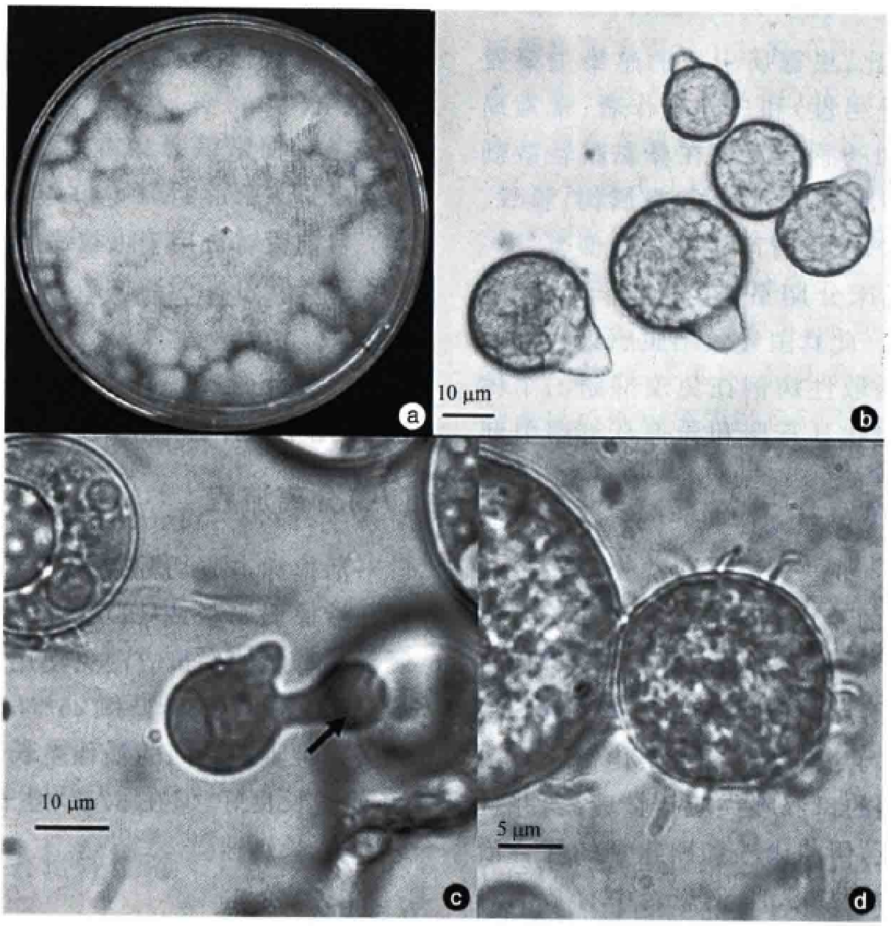


图 124-15 冠状耳霉菌

注：a. 在 PDA 平板培养 10 天粉末状的菌落；b. 有乳突的初生分生孢子；c. 被动释放的次生分生孢子(箭头)；d. 柔毛孢子，见彩插

(2)蛙粪霉目、蛙粪霉科：蛙粪霉属蛙粪霉存在于腐烂的水果和蔬菜中[107]，它可以作为肠道共生菌存在于两栖动物和爬行动物的肠道[182]。菌落在 PDA 培养基上黄色、蜡状、有放射状褶皱，初期不形成气生菌丝。它们在 25～37 ℃生长良好；培养 7～10 天后显微镜检查显示宽大的无隔菌丝，其断裂后形成游离的基本上无核的菌丝片段。蛙粪霉是同宗配合的，有性生殖由配子囊结合时发生，产生侧边有配子囊残留形成突起（喙）的厚壁接合孢子(图 124-16)。顶端膨大的初生分生孢子团强行排出球形初生分生孢子。次生分生孢子梨形（棒状），从孢子梗被动地释放出来。这些分生孢子具有一个乳突状的黏性顶端，偶尔可以见到有黏性顶端的细长形细胞[14,180]。

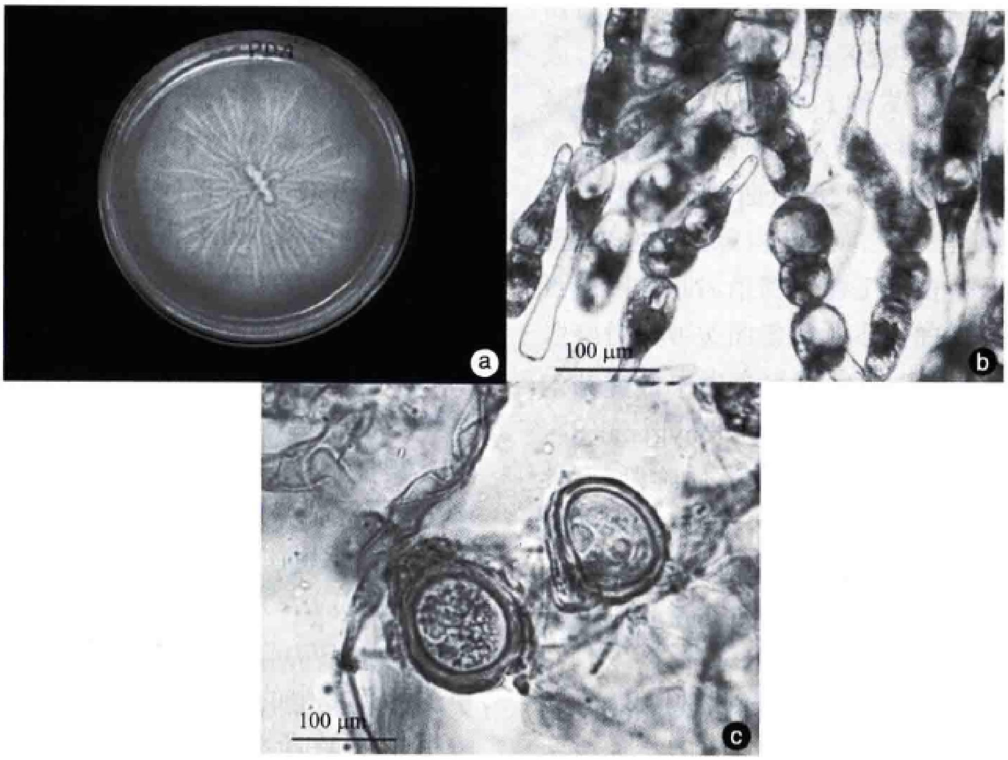


图 124-16　蛙粪霉

注：a. PDA 上培养 10 天褶皱的菌落；b. 无核的菌丝片段；c. 未成熟的接合孢子，见彩插

2. 分子鉴定　目前没有针对虫霉门的分子鉴定技术。

(十)分型系统

目前没有虫霉门分型的方法。

(十一)血清学试验

没有商品化的诊断试剂。

(十二)抗菌药物敏感性试验

体外药敏试验数据很少，一些技术问题（如培养液准备）有待解决。碘化钾在体外没有活性，然而在体内有效[183]。耳霉属和蛙粪霉属都对两性霉素 B、唑类和棘白菌素类表现出相对较高的 MICs[184-186]。Tondolo 报道特比萘芬是一种有效的抗闪光耳霉菌的药物[186]。总的来说，蛙粪霉属比耳霉属对不同抗真菌药物表现得更敏感。

(十三)结果的评价、解释和报告

在流行区域最终诊断是基于直接检查发现宽大的薄壁菌丝合并有 Splendore-Hoeppli 现象，没有坏死和血管侵犯。如果培养阳性，抗真菌药敏试验结果目前不影响治疗决定。

参考文献请扫二维码查阅

第125章 组织胞浆菌属、芽生菌属、球孢子菌属、副球孢子菌属及其他引起系统性真菌病的双相真菌

GEORGE R. THOMPSON Ⅲ, BEATRIZ L. GÓMEZ

(陈中举 译;吴文娟、陆玲 审校)

一、分类学

引起系统性真菌病的双相真菌属于散囊菌纲(Eurotiomycetes)爪甲团囊菌目(Onygenales)。爪甲团囊菌目有几个共同特征:其有性阶段(有性型)为由菌丝形成的网包裹许多未成熟的子囊(*asci*),还可能存在复杂的附属结构;其无性阶段(无性型)可形成单细胞的厚垣孢子,或形成可发育或不可发育的链状关节孢子。

爪甲团囊菌目包括阿耶罗霉科(Ajellomycetaceae)和爪甲团囊菌科(Onygenaceae)。爪甲团囊菌科与阿耶罗霉科均可以清楚地区别于节皮菌科(Arthrodermataceae)(皮肤癣菌,dermatophytes)。本章主要介绍爪甲团囊菌科和阿耶罗霉科中的双相真菌。非致病菌金孢子菌属(*Chrysosporium*)、*Uncinocarpus* 和其他相关菌属不在本章范围内。值得注意的是,尽管可能会保留广泛认可的双形性真菌的无性型名称,多态性真菌的双命名法已被停用[1]。阿耶罗霉科包含皮炎阿耶罗霉(*Ajellomyces dermatitidis*)、荚膜阿耶罗霉(*Ajellomyces capsulatus*)和杜波阿耶罗霉(*Ajellomyces duboisii*),其无性型相应地分别归类于芽生菌属[皮炎芽生菌(*Blastomyces dermatitidis*)、*B. gilchristii*、*B. helicus*、*B. parvus*、*B. percursus* 和 *B. silverae*]、伊蒙菌属[新月伊蒙菌(*Emmonsia crescens*)和 *Ea. sola*]和组织胞浆菌属[荚膜组织胞浆菌(*Histoplasma capsulatum*)和杜波组织胞浆菌(*H. duboisii*)]。新现的菌属 *Emergomyces*(*Emergomyces pasteurianus*、*Es. africanus*、*Es. orientalis*、*Es. Canadensis* 和 *Es. europaeus*),以及 *Emmonsiellopsis*(*Emmonsiellopsis terrestris* 和 *Emmonsiellopsis coralliformis*)包含的部分菌种还没有已知的有性型[2-3]。小芽生菌(*B. parvus*)和 *B. helicus* 以前归类于伊蒙菌属的无性型。DNA 序列数据显示副球孢子菌[巴西副球孢子菌(*Paracoccidioides brasiliensis*)和卢茨副球孢子菌(*P. lutzii*)]也属于阿耶罗霉科[4]。爪甲团囊菌科包括粗球孢子菌(*Coccidioides immitis*)和波萨达斯球孢子菌(*Coccidioides posadasii*)。分子系统发生学研究表明,爪甲团囊菌目中的菌种可分为几个进化枝(源自同一祖先)。在所有爪甲团囊菌目系统进化树中,致病菌与非致病菌均具有亲缘性,这表明其对人类感染的能力发生过无数次的演化。

(一)荚膜组织胞浆菌

历史上,荚膜组织胞浆菌分为 3 个变种:荚膜组织胞浆菌荚膜变种(*H. capsulatum* var. *capsulatum*),发现于南北美洲引起人类感染的病原体;杜波变种(*H. capsulatum* var. *duboisii*),发现于非洲引起人类感染的病原体[5];马皮疽变种(*H. Capsulatum* var. *farciminosum*),发现于北非和中东地区引起马和骡感染的病原体。系统发生学研究确定荚膜组织胞浆菌至少有 8 个进化枝:北美 1 类(NAm 1)、北美 2 类(NAm 2)、拉丁美洲 A 群(LAm A)、拉丁美洲 B 群(LAm B)、澳大利亚、荷兰(印度尼西亚)、欧亚和非洲共 8 个进化枝[6]。这 8 个进化枝中有 7 个包含基因和地理上不同的种群,可视为亲缘性物种,只有欧亚进化枝是源于拉丁美洲 A 群分枝。荚膜组织胞浆菌马皮疽变种属于欧亚进化枝。除了这 7 个亲缘性种群外,另

外由单一分离株代表的7个源自拉丁美洲的谱系也被确认[6]，这说明可能存在更多的亲缘性物种。随后有研究采取多位点序列分型的方法对生活在非病原流行区的猫感染荚膜组织胞浆菌进行研究，通过对经过福尔马林固定、石蜡包埋的病理组织中的荚膜组织胞浆菌进行分型，发现1个新的系统进化枝。这株分离自猫的荚膜组织胞浆菌序列与北美1类进化枝最接近，但分属于这一进化枝以外，这提示引起动物感染的荚膜组织胞浆菌可能存在另外的进化枝或亲缘性物种[7]。后来，利用不同的系统发育和群体遗传学方法，对组织胞浆菌早期的和新的序列进行了分析，提出了LAm A1、LAm A2、LAm B1、LAm B2、RJ和BAC-1为新的系统发育种，它们包含于先前的拉丁美洲A群分枝中[8]。最近一项利用附加序列信息的分析产生了部分不同的归类及新菌种的命名，NAm 1为密西西比组织胞浆菌(*Histoplasma mississippiense*)，NAm 2为俄亥俄组织胞浆菌变种(*Histoplasma ohiense* sp. nov)，LAm A为*Histoplasma suramericanum*，狭义的荚膜组织胞浆菌被归于巴拿马(H81)谱系[9]。

目前认为，非洲的组织胞浆菌病是独立存在的，但1株分离自南非的荚膜组织胞浆菌荚膜变种被证实属于非洲进化枝(杜波变种包含于此进化枝)，这一发现引发了对荚膜组织胞浆菌杜波变种在分类学位置上的争议[6]。荚膜组织胞浆菌的基因组为28～39 Mbp，目前有5株菌的序列可从网站获取(https://www.broadinstitute.org/fungal-genome-initiative/histoplasma-genome-project)。

(二)芽生菌

直到最近，芽生菌属还只包含皮炎芽生菌和*B. gilchristii*[10]。此后，*B. percursus*[3,11]、小芽生菌(*B. parvus*，以前为小伊蒙菌)、*B. helicus*(以前为*Emmonsia helica*)[12]和*B. silverae*[13]等分类被提出。对皮炎芽生菌的基因分型研究揭示了临床表型与基因群之间的联系，这些发现提示对菌种进行基因分型可能有助于预测患者的临床预后[14]，尽管这项工作还没有通过新鉴定的菌种来验证。高毒力临床分离株SLH14081和相对无毒力株ER-3[15]的皮炎芽生菌和*B. gilchristii*的全基因组序列与注释可在博德研究所(Broad Institute)的网站上查询(https://www.broadinstitute.org/fungal-genome-initiative/blastomyces-genome-project)。

(三)球孢子菌

系统发生学研究使得人们对球孢子菌属中的2个种有了认识。粗球孢子菌目前只在加利福尼亚州和华盛顿州[16]分离到，而波萨达斯球孢子菌的命名被建议用于该属其他所有菌种。最初认为，这2个分类单元是不能杂交的。然而，更多的证据表明，这2个种之间发生了杂交和基因渗入形式的基因互换[17]。对分离自委内瑞拉、墨西哥和巴西的菌株使用微卫星标记的方法进行了分析，在这些区域内发现了2个不同的分枝[18]。最近使用全基因组测序的工作进一步确定了与特定地理位置相关的遗传上不同的亚群[19]。对粗球孢子菌和波萨达斯球孢子菌的基因组序列分析已经完成[20]，目前，序列注释可在网站查询(https://www.broadinstitute.org/scientific-community/science/projects/fungal-genome-initiative/coccidioides-genomes和http://fungidb.org/fungidb/)。

(四)副球孢子菌

系统进化分析表明，巴西副球孢子菌至少可分为3个不同的种，分别为S1、PS2和PS3，这3个种似乎局限于地区流行[21]。高度分散的"Pb01样"群被命名为卢茨副球孢子菌[22-23]。最近，还提出了对PS2命名为美洲副球孢子菌(*Paracoccidioides americana*)、对PS3命名为*Paracoccidioides restrepiensis*及第5个系统发育的菌种PS4[24-25]命名为委内瑞拉副球孢子菌(*Paracoccidioides venezuelensis*)[26]，该种仅限于委内瑞拉。近期的基因组和形态学分析数据也有力支持了副球孢子菌属中的菌种存在有性周期这一观点[27]。通过对18S和几丁质合成酶基因序列进行分析发现，巴西副球孢子菌与不能培养的罗波拉卡菌(*Lacazia loboi*)(第130章)存在一定的关联，后者可导致拉卡菌病(lacaziosis)[28]。然而，这些序列还显示了充分的差异性，表明罗波拉卡菌应被视为一个独立的属[28]。

博德研究所完成了2株巴西副球孢子菌的参考菌株(Pb03和Pb18)和1株卢茨副球孢子菌(Pb01)的基因组序列分析、注解[29]及后续的更新[30](https://www.broadinstitute.org/fungal-

genome-initiative/paracoccidioides-genome-project)。最近,又发布了另外2株巴西副球孢子菌(菌株PbCnh,本种交配型a/MAT1-1的第一个基因组和菌株Pb300)的基因组序列[31]。

(五) *Emergomyces* 菌

阿耶罗霉科内发生了显著的分类学变化,最近提出了一个新现的属(*Emergomyces*)。

Emergomyces 属内包含典型菌种 *Es. Pasteurianus*[以前称为巴斯德伊蒙菌(*Emmonsia pasteuriana*)],以及4个最近鉴定出的菌种:*Es. africanus*[32]、*Es. orientalis*[33]、*Es. canadensis* 和 *Es. europaeus*[3,13]。*Emergomyces* 属被发现可引起免疫功能低下患者的播散性疾病[34],进一步确定这个新现菌属特征的工作正在进行中。*Es. africanus*(菌株CBS136260)及其姊妹菌种 *Es. pasteurianus*(菌株CBS 101426)的全基因组序列已完成,其表明两者都包含a杂交位点(*MAT*1-1)[3]。

2个以前属于伊蒙菌属的种已归入芽生菌属。小伊蒙菌被重新命名为小芽生菌;*Ea. helica* 被重新命名为 *B. helicus*,最近在加利福尼亚1例HIV感染的男性中报道[35]。

二、病原体的描述

(一)荚膜组织胞浆菌

荚膜组织胞浆菌是一种双相真菌,在环境中及低于35 ℃的条件下培养形成菌丝相,在组织内及高于35 ℃条件下培养形成酵母相。菌丝相可形成两种类型的分生孢子(图125-1),大分生孢子的壁厚,直径达8～15 μm,表面有特征性的结节状凸起;小分生孢子壁光滑,直径2～4 μm,具有感染性[36-37]。酵母相为小椭圆型的芽生孢子,直径2～4 μm,常被巨噬细胞所吞噬(图125-2和图125-3a)。在非洲的组织胞浆菌病中发现的酵母细胞壁厚且大,直径可达8～15 μm。

荚膜组织胞浆菌在世界各地的土壤中均有发现,在氮含量高的土壤中生长最好,特别是有鸟粪或蝙蝠粪存在的条件下。鸟类不是荚膜组织胞浆菌的宿主或感染对象(由于其体温很高),但它们的粪便是荚膜组织胞浆菌主要的营养来源。对鸟类栖息地进行清理后,其土壤将持续存在荚膜组织胞浆菌污染至少10年[38]。

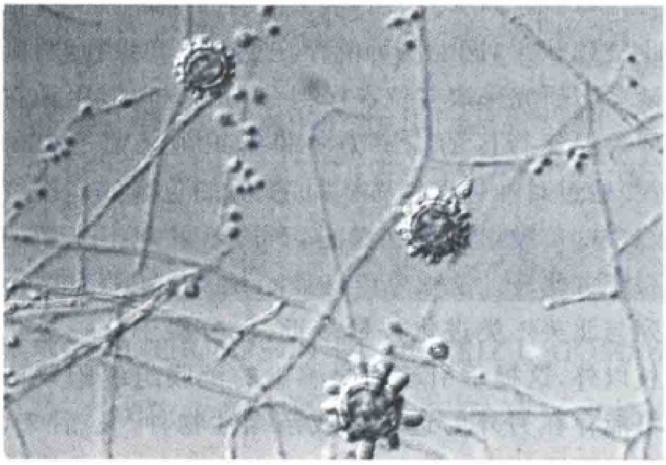


图125-1 荚膜组织胞浆菌菌丝相中含有表面有结节凸起的大分生孢子和表面光滑的小分生孢子。乳酸酚棉兰染色。放大倍数:约×245

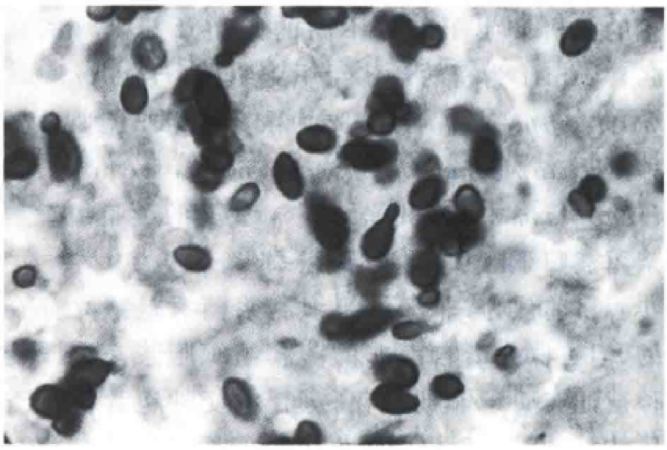


图125-2 荚膜组织胞浆菌的芽生分生孢子,GMS染色。放大倍数:约×290

组织胞浆菌病是北美最为常见的地方性真菌病,但在美国中部和南部也有报道[36,39]。在美国,密西西比河和俄亥俄河流域是荚膜组织胞浆菌最为流行的地区,但流行区域依然遍布了美国大陆的东半部。其他的流行地区还包括非洲国家、澳大利亚和东亚国家,尤其是印度和马来西亚。

(二)芽生菌

皮炎芽生菌、*B. gilchristii* 和 *B. percursus* 是双相真菌,在适合的温度和营养条件下可由菌丝相转化为酵母相。在室温条件下培养可见白色羊毛状菌丝(图125-4),小分生孢子椭圆形或梨形,直径2～10 μm,不产大分生孢子。在组织中或37 ℃于合适的培养基中培养,可见大的、圆形、

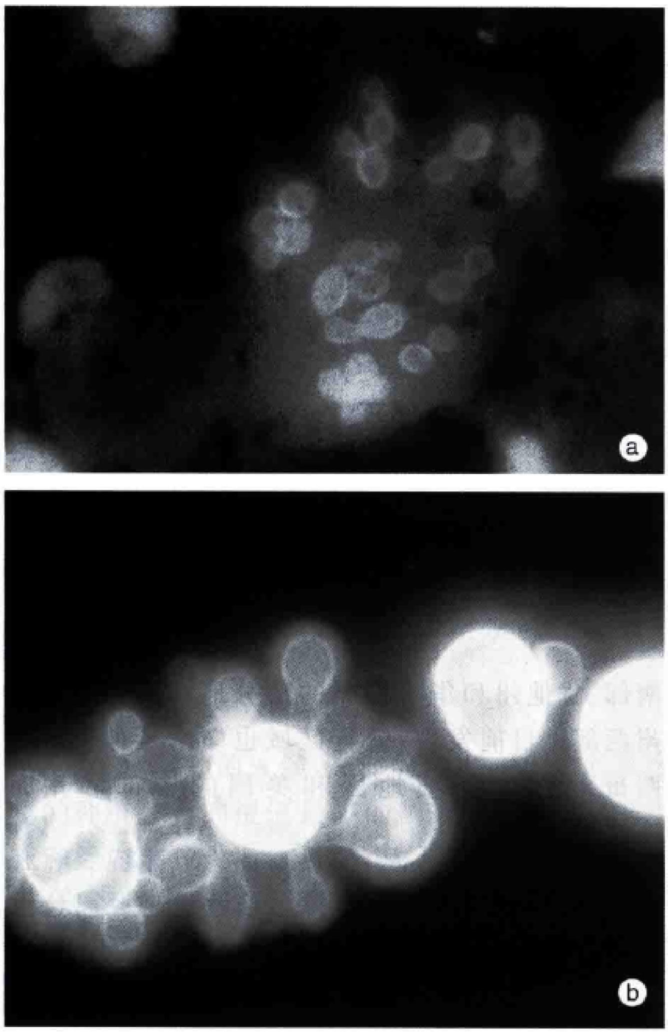


图 125-3 a. 对痰标本进行钙荧光白湿片染色可见荚膜组织胞浆菌的芽生分生孢子。原始放大倍数:约×475。图片来自美国临床病理协会。b. 对痰标本进行钙荧光白湿片染色可见巴西副球孢子菌的芽生分生孢子。放大倍数:约×255,见彩插

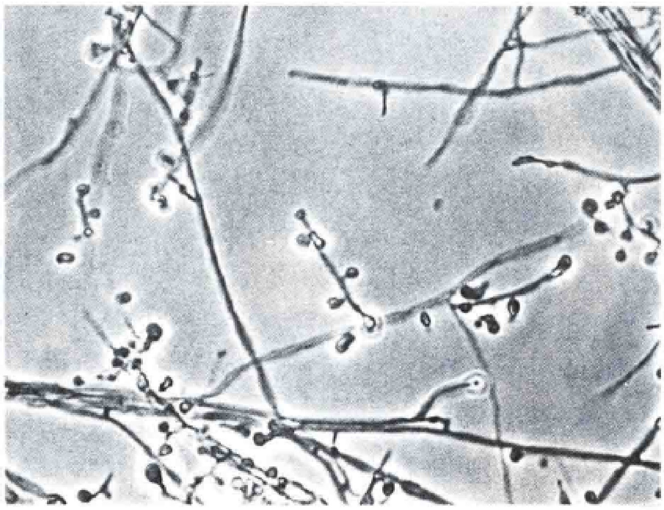


图 125-4 皮炎芽生菌的菌丝相。放大倍数:约×240

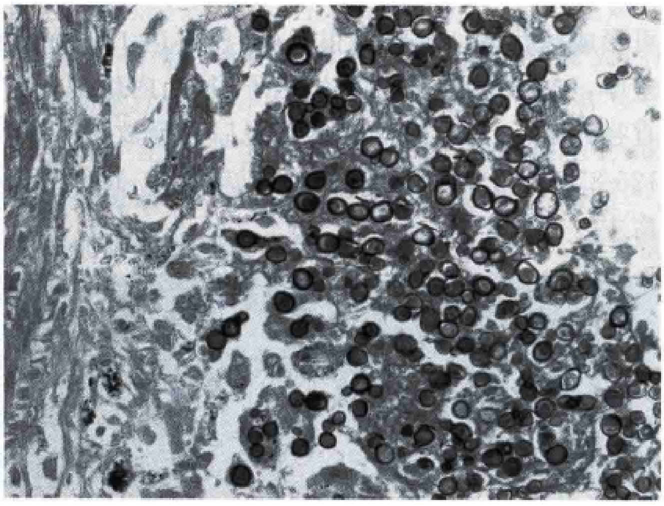


图 125-5 皮炎芽生菌的芽生分生孢子。GMS 染色。放大倍数:约×290

厚壁的酵母细胞,直径 5～15 μm,芽生孢子与母体有宽大的基底连接(图 125-5)。酵母细胞在吞噬细胞内外均可存在。*B. helicus* 和 *B. silverae* 最近才被描述,它们的表型与皮炎芽生菌相似[12]。小芽生菌的菌丝相在菌丝两侧或短的侧枝上产生小的单细胞分生孢子(大小约 4 μm)。在宿主体内,分生孢子转变为被称为不育大孢子(adiaspores)的结构(图 125-6),类似球孢子菌的球体。小芽生菌的不育大孢子比 *Adiaspiromyces crescens* 小,为 10～25 μm,可在 40 ℃生长[40]。

土壤是皮炎芽生菌的天然栖息地,尤其邻近水源。因其很难从自然界被分离到,所以芽生菌的生态学还没有被完整地定义[41]。高氮含量和高有机物含量的潮湿的酸性土壤是芽生菌最适的生存场所。较高的土壤温度和近期的降雨有利于芽生菌的生长。

芽生菌病报道最多的是北美,但也流行于非洲,以及美国的中部和南部。在美国,最常见的报道来自于密西西比河和俄亥俄河流域。在加拿大,芽生菌病主要流行于与五大湖相邻的省[42]。

(三)球孢子菌

在环境中和室温条件下培养,球孢子菌形成菌丝相,产生有隔菌丝和交互性的关节孢子链(图 125-7)。当关节孢子链成熟时,交互连接的孢子在细胞溶解酶的作用下释放出桶状的关节孢子,直径 2～5 μm,这些释放出来的关节孢子具有感染性。在宿主体内和特殊的培养基中,关节孢子

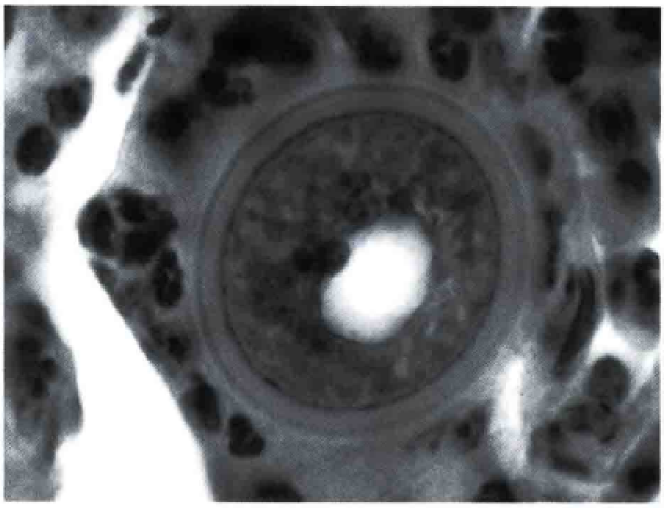


图 125-6 小鼠组织中小芽生菌的不育大孢子。PAS 染色。放大倍数：约×280

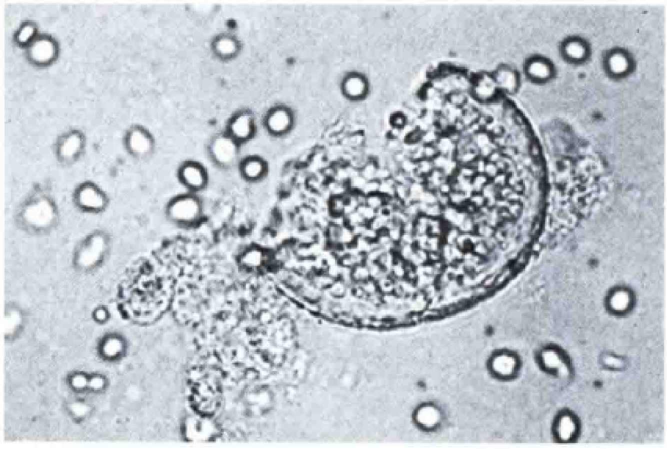


图 125-8 KOH preparation of pus from a lesion showing a Coccidioides spherule and endospores. Magnification, ~×290. Reprinted with permission from reference 154

可形成球状体。球状体很大(直径可达 120 μm)、壁厚，包含成百上千的内生孢子，每个内生孢子的直径为 2～4 μm，在球状体破裂后可释放出来(图 125-8*)，每个内生孢子再发育成球状体，持续感染宿主。

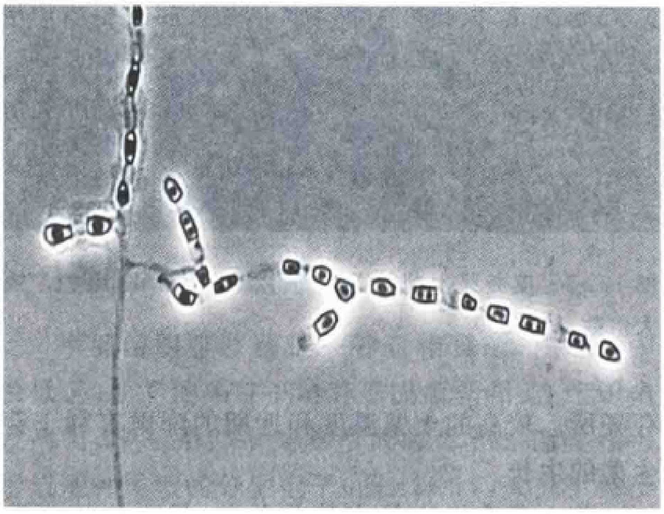


图 125-7 粗球孢子菌菌丝相中交互性的关节孢子。乳酸品红染色。放大倍数：约×250

球孢子菌是土壤中栖息的真菌，地域分布局限[43]。一般局限于西半球、西南部沙漠地区，虽然推测这些地区可能存在动物传染源，但这种推测还未得到证实[44]。美国的流行地主要包括加利福尼亚州中部和南部、亚利桑那州南部、新墨西哥州南部、犹他州和华盛顿州的部分地区和得克萨斯州西部。目前发现，流行区域也向南延伸到了墨西哥北部的沙漠地区和美国的中部和南部地区[44]。

(四)副球孢子菌

巴西副球孢子菌和卢茨副球孢子菌是双相真菌，室温生长可形成菌丝相，其生长速度较慢，需长达 30 天的漫长培养。在营养丰富的培养基上可形成细的分隔菌丝(1～3 μm 宽)，呈交织丝状，偶见厚垣孢子。在营养缺乏的条件下，某些菌株可产生小于 5 μm、可为插入、分隔或有梗的(起源于窄基底)关节孢子或小分生孢子等不同的形态。分生孢子形态根据温度改变而有所不同，在合适的培养基中，20～24 ℃出芽形成菌丝，36 ℃可转化为酵母。酵母细胞大多为椭圆形，典型的形态为围绕母体细胞周围生出许多出芽，与舵轮或水手轮的外形相似(图 125-3b，图 125-9)。

虽然已从土壤中分离到副球孢子菌属，但对其精确栖息地的了解依然有限。流行区域从墨西哥(北纬 23°)到阿根廷(南纬 34°)，覆盖了这一纬度范围内的智利、苏里南、圭亚那、尼加拉瓜、伯利兹和大多数加勒比群岛。在疾病流行的国家，副球孢子菌病只在生态特征相对确定的地区能够被诊断，这些生态特征包括热带和亚热带的森林、丰

*译者注：原著引用其他著作图，未经原作者授权翻译，故此保留原图

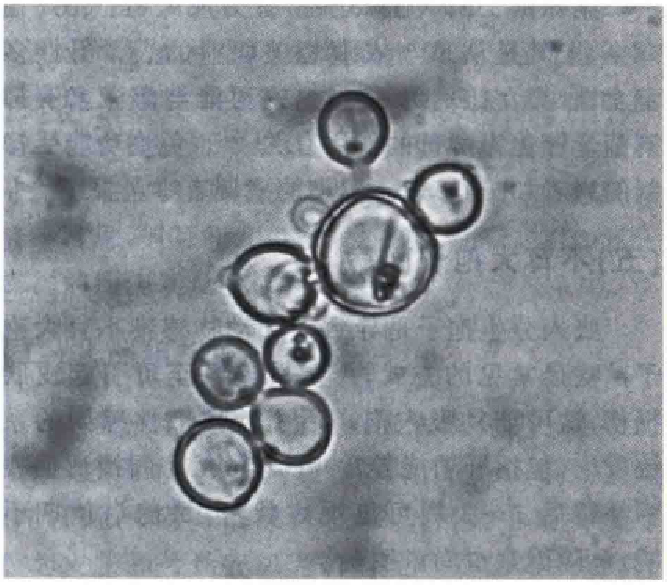


图 125-9 湿片,巴西副球孢子菌的芽生分生孢子。放大倍数:约×290

富的水道、温和的气候、充沛的雨水、咖啡/烟草作物的种植。病例报道最多的国家为巴西、哥伦比亚和委内瑞拉[45-47]。目前,从人类的临床标本中已分离到许多例巴西副球孢子菌,从九带犰狳组织中也分离过,但较少从北部秃尾犰狳体内分离到,偶有分离自狗或其他动物的报道[45]。

(五)伊蒙菌

在室温环境中培养,伊蒙菌属形成菌丝相,在菌丝的两侧或短分枝侧可产生小的、单细胞的分生孢子(直径约 4 μm)。在宿主体内,新月伊蒙菌形成上文提到的不育大孢子。虽然不育大孢子形态很大、壁厚,但其不产生内生孢子,在体内不能繁殖,最终死亡,故其可能不从肺部播散[48]。不育大孢子可在营养丰富的培养基上生长。一些新月伊蒙菌在 37 ℃产生大的(25~400 μm)、多核的不育大孢子。新月伊蒙菌的天然栖息地是土壤,可引起许多啮齿类动物、穴居哺乳动物和捕食它们的动物的感染。导致人类感染或疾病的报道最初很少见,但随后的报道来自北美洲、中美洲和南美洲,以及几个欧洲和亚洲国家,最近又有来自南非的报道。以前,早期的病例报道主要来自于巴西[40]。然而,鉴于有来自南非[49]的报道,这些真菌引起的疾病在地理范围上已变得不清楚。

(六)*Emergomyces* 菌

Es. pasteurianus(以前称为巴斯德伊蒙菌)在组织中不能产生不育大孢子,然而,在 37 ℃营养丰富的培养基上,可产生类似芽生酵母细胞的结构。Emergomycosis 最早的病例在南非的西开普省被诊断,由目前所知的 *Es. Africanus* 所引起。但在其他地区对双相真菌的分子鉴定也检测到了病例,包括南非 9 个省中的 6 个省及莱索托王国[50]。

在环境中或在低于 30 ℃温度体外生长时,*Emergomyces* 菌以菌丝形式存在[3,51-52]。相反,在活体内,在受感染的组织中或当其在实验室 35 ℃下生长时,可以观察到芽生酵母细胞[51]。*Es. africanus*、*Es. Pasteurianus* 和 *Es. orientalis* 的最低生长温度为 6 ℃,最佳生长温度为 24~27 ℃,最高可在 40 ℃生长。形态学上,在室温条件下为丝状菌落、呈米黄色、生长缓慢,分生孢子梗短而不分枝,与薄壁透明菌丝成直角,顶部稍膨大,有时有短的次级的分生孢子梗,分生孢子梗有 3 个以上为一组的分生孢子[3,51]。在体温条件下,菌落呈酵母状:小、奶油色到光滑的灰褐色、聚集[3],小的卵圆形酵母细胞具有狭窄的芽;有时,也可能存在具有更宽基底部出芽的较大细胞[3,51]。

三、流行病学和传播

(一)组织胞浆菌病

吸入小分生孢子是人类感染荚膜组织胞浆菌最常见的方式。潜伏期 1~3 周,再次感染潜伏期变短(暴露后 4~7 天)。组织胞浆菌病不具传染性,但有通过器官移植由供者传播给受者的报道[53]。

最主要的感染风险因素是环境暴露[37],风险取决于几个因素:环境特性、进行的活动、接触灰尘和土壤的时间和程度。长时间的深度暴露通常导致严重的肺部疾病。多数病例与在荚膜组织胞浆菌所污染的环境中暴露过或处理鸟类或蝙蝠粪便堆积物的活动有关[38]。

基础疾病增加了患者发生某些型组织胞浆菌病的风险。存在细胞介导的免疫缺陷的患者(如 HIV 感染者、移植受者、接受肿瘤坏死因子-α 抑制剂治疗的类风湿关节炎患者)常容易发生播散性感染。免疫功能受损的组织胞浆菌病患者的死亡率高于免疫功能正常的患者[54]。

(二)芽生菌病

吸入孢子是导致芽生菌病常见的感染方式。潜伏期通常4～6周,尽管有些患者在暴露几个月后才出现症状[55]。芽生菌病不具传染性。

疾病暴发常与沿着小溪或河流的职业活动和旅游活动有关,因为在这些地方通常会暴露于富含腐烂植物的潮湿泥土环境中。除了暴发的情况,芽生菌病更多见于成人。男性发病多于女性,在最近一次的暴发流行中亚裔人口的发病率高于非亚裔人口[56]。此外,芽生菌病常发生于户外职业者和旅游爱好者。

皮炎芽生菌作为一种条件致病菌不是很常见,但其更容易造成细胞介导的免疫缺陷患者如HIV感染者和移植受者发生侵袭性感染。免疫功能受损的皮炎芽生菌病患者的死亡率高于免疫功能正常的患者[57]。

(三)球孢子菌病

吸入关节孢子是导致人类感染球孢子菌病最常见的方式。潜伏期1～3周。与组织胞浆菌病不同,球孢子菌感染后治愈的患者通常可获得免疫力。球孢子菌病不具传染性,但偶有通过污染物人传人的报道[58],也有通过器官移植由供者传播给受者的报道[59]。

最主要的感染风险因素是环境暴露,风险取决于几个因素:环境特性、进行的活动、接触灰尘和土壤的时间和程度。感染的发生与翻整土地的活动有关,如建筑施工、园林绿化、耕种、考古发掘及其他与翻整土地有关的休闲活动[60]。地震、风暴等可导致大量粉尘产生的自然事件也增加了感染的风险,甚至可能导致疾病的大暴发[61]。

播散性球孢子菌感染多发于非裔、亚裔、菲律宾人和怀孕前3个月的孕妇,细胞介导的免疫缺陷人群如艾滋病患者和使用免疫抑制剂的患者也是播散性感染的高危群体[62]。

(四)副球孢子菌病

吸入分生孢子是导致人类感染副球孢子菌病最常见的方式。潜伏期目前不明,但可以明确的是,自最初的无症状感染开始,菌体可在淋巴结内存活相当长的时间。副球孢子菌病不具传染性[63]。

副球孢子菌病主要感染者为成人,占85%～95%,尤其是从事与农业相关职业的人。男性多于女性(男女比例为15:1),这可能与雌激素有抑制菌丝转化为酵母的作用有关[63]。免疫功能受抑制的患者如HIV患者感染的病例有零星报道。

(五)不育大孢子菌病

吸入分生孢子是导致人和动物感染不育大孢子菌病最常见的方式,严重感染甚至可引起皮肤损伤,这可能是吸入孢子后引起播散性感染的系统反应(包括肝功能异常)[64]。虽然有间接证据表明暴露后1～3周可出现症状,但目前潜伏期不明,危险因素也尚未明确。

(六)Emergomycosis

据推测,感染发生在吸入空气中的繁殖体后。事实上,在南非开普敦地区的空气中常检测出*Es. africanus*的DNA,那里已有Emergomycosis的诊断病例[32]。还没有*Emergomyces*菌属中其他菌种类似的流行病学细节。所有Emergomycosis均发生于免疫功能低下的患者,最常见的是由HIV感染引起的细胞介导免疫缺陷。

四、临床意义

(一)组织胞浆菌病

组织胞浆菌病的临床表现有很多类型,在未治疗的情况下,可以由短暂的肺部感染未经治疗转变成慢性肺部感染,也可以转变为更广泛的播散性疾病[36-37]。许多健康人群在特定的流行区暴露于病原体后并不产生任何症状,但暴露于大量病原体时会导致急性症状,通常是严重的流感样疾病。这些症状包括发热、寒战、头痛、干咳、肌肉疼痛、胸痛、食欲减退、疲劳等,通常数周后消失。最严重的类型是播散性组织胞浆菌病,如果不及时治疗,这种急性感染可能在数周之内致命(多见于婴幼儿、AIDS患者和实体器官移植患者),也可导致无痛的、多部位受累的慢性疾病。最近的数据表明,组织胞浆菌病引起越来越多的患者住院,很可能是由于免疫抑制人群增加的原因[65]。

在非免疫抑制的播散性组织胞浆菌病患者中,肝脏感染最为常见,肾上腺受损也较多,超过60%的患者存在黏膜溃疡。口腔和咽喉常受累,

但损伤也可发生于唇、鼻或其他部位。5%～20%的患者可发生中枢神经系统疾病，表现为慢性脑膜炎或局灶性脑损伤。对于 AIDS 患者，播散性组织胞浆菌病通常与 CD4 T 淋巴细胞计数降低和非特异性症状（如发热和体重减轻）有关，黏膜病变不常见，但可能发生多发性皮肤病变，有 10%～20%的病例累及中枢神经系统[36-37]。

(二)非洲组织胞浆菌病

非洲组织胞浆菌病的临床表现有别于传统的组织胞浆菌病，其发病缓慢，尽管最近的报道显示77%的感染者有播散性感染[5]，但其主要受累部位为皮肤和骨骼。患者若有更广泛的累及肝脏、脾脏和其他器官的感染不能及时得到治疗，这种发热性消耗性疾病可在数周或数月内致命。面部和躯干常见多发性皮肤病变，这种病变通常会扩大并溃烂。约 30%的患者会发生骨髓炎，感染可能扩散到相邻的关节，引起关节炎，也可侵袭邻近的软组织，导致皮下脓肿。

(三)芽生菌病

芽生菌病的临床表现有很多类型，在未治疗的情况下，可以由短暂的肺部感染转变成慢性肺部感染，也可以转变成更广泛的播散性疾病[66]。急性肺芽生菌病通常表现为非特异性流感样疾病的症状，与社区获得性肺炎、原发性组织胞浆菌病和球孢子菌病的症状类似。健康人群通常在 2～12 周后即可康复，但有些患者在几个月后又会发生其他部位的感染。一部分急性芽生菌病患者无法康复而发展为慢性肺疾病或播散性感染。

在肺外，皮肤和骨骼是最常见的受累部位。超过 70%的患者有皮肤感染，病变部位呈边界不规则的疣状凸起或溃疡，溃疡也可发生于鼻腔、口腔和咽喉黏膜。约 30%播散性感染的患者会发生骨髓炎，脊柱、肋骨和长骨是最常见的受累部位。约 10%的患者会发生关节炎。除了免疫功能低下的患者外，很少发生脑膜炎。有时也会累及其他器官，如男性泌尿生殖道、肾上腺、甲状腺、肝、脾脏和胃肠道[55]。

(四)球孢子菌病

虽然暴露于球孢子菌后会出现很多临床症状，但超过半数的球孢子菌感染是无症状的。有症状的疾病中最常见的为一种叫溪谷热（valley fever）的亚急性感染（原发性球孢子菌感染）。咳嗽、发热、寒战、疲乏等呼吸道症状最为常见，可持续数周到数月。在流行区域，原发性球孢子菌肺炎占社区获得性肺炎的 17%～29%[67-68]。高达50%患者在症状出现的前几天躯干和四肢会出现轻度弥漫性红斑或斑丘疹，这种临床症状也可用于和细菌性肺炎进行鉴别[69]。约 5%的感染者可出现持久的有特征性的结节性红斑或多发性红斑样的皮疹。其他健康感染者在未经治疗的情况下，症状可在数周到数月内消失。

只有不到 3%的患者发展为播散性球孢子菌病，虽然在免疫功能抑制的患者中由静止性感染转为活动性感染可能较晚发生，但这种疾病进展通常发生在感染最初的 3～12 个月内。如果不及时治疗，这种急性感染可能在数周之内致命，也可能发展为持续数月至数年的慢性病。可累及一个或多个部位，皮肤、软组织、骨骼、关节和脑膜受累最常见，皮肤和皮下损伤较为常见，约 40%的患者发生骨髓炎，常累及脊柱、肋骨、颅骨和长骨的末端。疾病可侵袭相邻的关节，引发关节炎，或侵入邻近的软组织，形成皮下脓肿。脑膜炎是球孢子菌病最严重的并发症，发生于 30%～50%播散性球孢子菌病患者，若不进行治疗，几乎百分百致命[70]。

(五)副球孢子菌病

副球孢子菌病包括接触真菌后产生的亚临床感染。副球孢子菌最初的感染部位通常是肺，但病原体可以通过淋巴系统抵达局部的淋巴结。多数情况下，原发感染没有临床症状。然而，儿童和青少年有时可发生急性播散性感染，主要表现为浅表和(或)内脏淋巴结肿大，也可见于免疫功能低下的患者，此种情况预后不良。

发生于成人的慢性副球孢子菌病的特点是肺部明显受累和肺外损伤，这是主要的感染类型，约占 90%[63]。在 80%的病例中，疾病累及肺部，病原体侵袭肺部后进展缓慢，过程持续数月甚至数年。面部、口腔和鼻腔的皮肤黏膜溃疡是最明显的症状，其他感染部位包括大肠或小肠、肝脏和脾脏、肾上腺、骨关节、中枢神经系统和男性泌尿生殖道。60%～80%的病例可见活动性的肺部受累及残余的纤维化损伤。50%～80%的患者出现这种残余类型的损伤，说明纤维化瘢痕取代了以前

活跃的病灶部位，这种病变可使患者的呼吸功能降低或丧失。副球孢子菌感染可以是潜伏性的，但在某些恶劣环境下疾病可以复燃，比如慢性酒精中毒、营养不良和吸烟[63]。

(六)不育大孢子菌病

多数情况下，不育大孢子菌病引起一种自限性的、局部的肺部感染，症状轻微或无症状。因为不育大孢子只生长变大而不能繁殖，所以疾病的症状和体征取决于吸入孢子的数量。有些患者是在做其他的肺部检查时偶然发现的。然而，在不育大孢子菌病患者中，干咳、呼吸困难和发热并不少见。虽然有重症或致死性病例的报道，但这种情况非常少见[40]，最近有免疫缺陷伴皮肤损伤和肝功能异常患者发病的报道[40,71]，以及眼部不育大孢子菌病暴发的报道[72]。

(七)Emergomycosis

Emergomycosis(以前被称为播散性伊蒙菌病，*Es. Africanus* 感染的病例是其最好的描述)最常见的临床表现是广泛的皮肤病变，发生在95%的患者身上[50-51]。

五、标本的采集、运输和储存

标本的采集、运输和储存详见本书第117章。适当时应采集组织标本，分别进行微生物学和组织病理学检查。可能的情况下，需进行特殊的组织染色如六胺银染色(Grocott-Gomori methenamine silver, GMS)和过碘酸雪夫染色(periodic acid-Schiff, PAS)。因双相真菌不发生定植，故显微镜检查和(或)培养阳性可确认为感染。也可对血液、尿和脑脊液进行核酸扩增、抗原和(或)抗体的检测。对无细胞的病原体DNA进行的二代测序技术的发展受到了广泛关注，尽管目前还没有通过这种方法获得的数据，但可能有助于地方性真菌感染的诊断。

(一)荚膜组织胞浆菌

若多次采集标本，可从60%～85%慢性肺部组织胞浆菌病患者的痰或支气管肺泡灌洗液中分离到荚膜组织胞浆菌[73]。播散性感染的患者可采集血液、尿、淋巴结和骨髓标本进行培养。骨髓培养的阳性率大于75%。使用溶解离心分离系统(Wampole Laboratories, Princeton, NJ)或Bactec含溶血素真菌瓶(BD Diagnostic Systems, Franklin Lakes, NJ)进行的血培养敏感性很高。也可对活检标本进行检测，如口腔、皮肤、胃肠道病变、肾上腺、肝和脾等。组织胞浆菌脑膜炎诊断较困难，脑脊液培养阳性的比例不超过2/3，多次对较大量的脑脊液标本(每次10～20 ml)进行培养可获得最好的结果。

(二)芽生菌

可采集痰、支气管肺泡灌洗液或肺活检标本。对皮肤感染的病例可采集皮肤活检标本，对泌尿生殖道芽生菌病的病例按摩前列腺后采集尿更利于诊断。

(三)球孢子菌

除了下呼吸道标本，还可采集化脓性皮肤病变和软组织损伤标本进行镜检和培养。脑脊液病原体分离率较低(约为30%)，通常只有在大量标本(10～20 ml)培养后才能分离到[74]。

(四)副球孢子菌

除了下呼吸道标本，还可采集口腔或咽部病变、皮肤病变、淋巴结、肾上腺和胃肠道标本。这些标本若采用单一湿片进行检查，发现巴西副球孢子菌的比例可大于85%[63]。

(五)伊蒙菌

对新月伊蒙菌的诊断主要基于其独特的病理学表现，可见形成的肉芽肿内存在典型的单一、大的、壁厚的不育大孢子。

(六)*Emergomyces* 菌

目前，Emergomycosis的诊断通过组织病理学检查受累组织中酵母相的存在或从适当的标本(如皮肤组织、血液、骨髓、肺组织、肝组织和淋巴结)中分离到真菌[75]。

六、直接检测

(一)显微镜检查

对临床标本进行直接镜检可以为系统性真菌

感染提供快速的初步诊断。然而，值得注意的是，组织胞浆菌和芽生菌在组织内形成的酵母细胞形态非常相似。此外，它们与各种念珠菌、新型隐球菌、格特隐球菌、马尔尼菲篮状菌(*Talaromyces marneffei*，以前称为马尔尼菲青霉菌)及球孢子菌的内生孢子在组织内的形态也非常相似。使用钙荧光白(一种可以与真菌细胞壁结合的荧光染料)对新鲜的痰、支气管肺泡灌洗液、脑脊液、尿、脓液或其他标本进行湿片染色常有助于初步鉴定。

1. 荚膜组织胞浆菌 吉姆萨和瑞氏染色可用于血液或骨髓涂片中荚膜组织胞浆菌酵母细胞的检测，这些酵母细胞也可见于GMS或PAS染色的组织切片中，但在苏木素-伊红染色(HE)的组织切片中通常不可见。标本中观察到小的(直径2～4 μm)、椭圆形的芽生酵母可初步诊断组织胞浆菌病。菌体可在吞噬细胞内，也可游离于组织中。在对痰或其他呼吸道标本进行的细胞学检查中很少能发现组织胞浆菌。非洲组织胞浆菌病由厚壁、窄基底的芽生酵母引起，其直径可达10～15 μm，在组织切片中的大小约为典型的荚膜组织胞浆菌的4倍，偶尔会与芽生菌属混淆。

2. 芽生菌 对痰、组织和渗出物标本进行钙荧光白或KOH湿片镜检及革兰染色能观察到芽生菌大的、圆形的酵母细胞。宽基底的芽生孢子一般在达到母体大小才与母体分离。偶尔可在组织中见到"巨型"酵母细胞(直径大于40 μm)或菌丝。使用PAS染色或GMS染色进行组织病理学检查也很有价值。在小芽生菌感染病例的肺组织中可见不育大孢子。

3. 球孢子菌 对组织切片进行PAS染色、GMS染色或HE染色，可检测到球孢子菌典型的、大的、厚壁的球状体结构。对痰、支气管肺泡灌洗液、脓液或其他标本进行KOH湿片镜检也有助于诊断，但敏感性较低。威克汉姆无绿藻(*Prototheca wickerhamii*)可产生与球孢子菌相似的较小的球状体，而西伯鼻孢子菌(*Rhinosporidium seeberi*)可产生相似的较大的球状体。

4. 副球孢子菌 在对痰、纤支镜灌洗液、淋巴结引流脓液或组织活检标本直接镜检时常可发现典型的、细胞壁半透明的、有多个出芽的巴西副球孢子菌酵母细胞，可使用乳酸酚棉兰染色、亚甲蓝染色、革兰染色或钙荧光白染色等染色方法。组织切片可进行PAS染色、GMS染色或HE染色。

5. 伊蒙菌 对肺组织切片进行PAS染色或GMS染色是从肺组织标本中找出伊蒙菌属典型的不育大孢子最有效的方法。值得注意的是，在疾病的慢性期时，菌体可能崩解成类似于其他真菌、蠕虫或花粉颗粒的各种不同形状。此外，不育大孢子还需与球孢子菌的球状体相鉴别，前者不含内生孢子，且不育大孢子通常比空的球孢子菌球状体要大。

6. *Emergomyces* 菌 现在归类于*Emergomyces*的菌种与传统的伊蒙菌(新月伊蒙菌和小芽生菌)在表型上的差异为：前者产生芽生酵母，而后者在体外产生不育大孢子[51]。

(二)抗原检测

1. 荚膜组织胞浆菌 基于双抗体夹心酶联免疫法(enzyme immunoassay，EIA)的酶标板对组织胞浆菌多糖抗原(histoplasma polysaccharide antigen，HPA)进行检测是一种广泛应用的方法，可对播散性组织胞浆菌病患者的尿、血清或脑脊液进行检测，敏感性高达95%[76]。此方法也可用于急性肺组织胞浆菌病的早期诊断和治疗效果监测[77]。虽然所有标本单次测试的最小标本量仅为0.5 ml，但建议采集足够的标本量，如尿5 ml、血清5 ml、脑脊液1 ml。此外，推荐对血清和尿标本同时进行检测以提高检测敏感性。将治疗前的最后一个阳性标本与治疗至少14天后新采集的标本进行平行检测，可评估治疗是否有效[78]。有几个商业实验室可进行此项目的付费检测。因这些检测的建立，应用组织胞浆菌抗原捕获单克隆抗体的酶联免疫分析法(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)(*Histoplasma* galactomannan monoclonal ELISA)的商品化试剂盒已被Immuno-Mycologics[(IMMY), Norman, OK]开发出来。该试剂已在美国的2个实验室进行了评估，在诊断组织胞浆菌病方面显示出很高的性能[79-80]。此外，该试剂目前已在2个拉美国家(哥伦比亚和危地马拉)进行了测试，显示了很高的敏感性和特异性，分别为98%和97%[81]。

对患者血清中1,3-β-D葡聚糖(真菌细胞壁上的一种成分)的检测在组织胞浆菌病中应用的评价还比较有限，但一些初步的证据表明其对诊断

组织胞浆菌病有价值(敏感性为87%,特异性为65%),1,3-β-D葡聚糖阳性的结果需用特异性组织胞浆菌检测方法来确认[82]。

2. 芽生菌 芽生菌抗原检测试验是基于双抗体夹心酶联免疫法用酶标板条对播散性芽生菌病患者中血液抗原和尿抗原进行检测的一种方法。在播散性芽生菌病患者中敏感性可达89%,检测尿标本的敏感性高于血液[83],由于与其他地方性真菌病有交叉反应,整体的特异性只有79%[84]。临床报告显示尿检测的敏感性较低,但连续检测有助于疾病的监测[85]。MiraVista Diagnostics 可提供此项目的付费检测。

对芽生菌病患者血清中1,3-β-D葡聚糖检测的评估还不足够,但一些初步的证据表明其对诊断芽生菌病毫无价值[82]。

3. 球孢子菌 在一个大样本免疫抑制人群中,球孢子菌尿抗原(MiraVista)检测的敏感性为71%[86],但在从事兽医职业的人群中敏感性低于20%[87]。抗原检测可用于脑脊液的检测[88],样本要求与HPA试验一致。

血清中1,3-β-D葡聚糖的检测对诊断球孢子菌病价值的评估较有限,这些评估的敏感性只有44%[89]。

4. 副球孢子菌 目前为止,副球孢子菌病抗原检测尚未常规应用于疾病诊断中。有报道称,一种43 kDa的糖蛋白和一种87 kDa的热休克蛋白是血清抗原检测有效的靶点[90-91]。有些报道阐述了对尿、脑脊液和支气管肺泡灌洗液中巴西副球孢子菌抗原的检测[91]。还有文章报道在治疗有效时,血清中的抗原水平可以降低甚至消失[92]。

5. 伊蒙菌 目前尚无诊断人类不育大孢子菌病的抗原试验。

6. *Emergomyces* 菌 目前尚无诊断人类Emergomycosis的抗原试验。

(三)临床标本的核酸检测

直到最近才有一个商品化的体系可用于检测人体临床标本中该类真菌的核酸(GeneSTAT. MDx *Coccidioides* test)(见下文)。但有许多"自建"检测方法仍在研究中,其中一些方法本节中会重点介绍。rRNA基因的保守区被用作识别的靶位。值得注意的是,基因保守区的扩增不但可以针对病原性真菌,也可针对基因相近的非病原性真菌。检测中可能由于原始样本中腐生菌的定植、标本采集过程的污染或PCR试剂被真菌DNA污染等情况,产生一些非特异性扩增。因此,对基因保守区扩增产物进行测序确认尤为必要。在近期的研究中,目标真菌特异性基因被选定为PCR扩增的靶位,这样可以减少非特异性的问题。

1. 组织胞浆菌病 使用PCR方法检测标本中荚膜组织胞浆菌DNA的报道越来越多,标本种类包括石蜡包埋固定的组织、血液、支气管肺泡灌洗液、骨髓及眼部标本。早期有针对内转录间隔区(internal transcribed spacer,ITS)的研究,但针对荚膜组织胞浆菌独有的靶位基因能取得更好的特异性。Bialek等[93]设计了一种巢式PCR的方法来扩增荚膜组织胞浆菌中编码一个100 kDa大小蛋白的基因,这种蛋白是荚膜组织胞浆菌特有的,该方法被成功应用于来自法属圭亚那和哥伦比亚的组织胞浆菌病患者的临床标本检测(敏感性为100%,特异性为95%)[94-95]。目前,将这种巢式或半巢式PCR与实时荧光定量PCR(real-time PCR)结合使用被认为很有前景[96]。最近,一个评估小组对最常使用的"自建"方法的重复性开始了评估[97]。最近,在一个限定为组织胞浆菌病感染的动物模型为中,以3个蛋白编码基因(100 kDa蛋白和H、M抗原)为靶点的实时PCR方法被评估,并得出结论:100 kDa蛋白和H抗原分子检测是诊断该真菌病有前景的试验[98]。

2. 芽生菌病 针对核糖体基因、ITS区、重复序列及种(属)特异性基因的PCR检测均曾被评估用于皮炎芽生菌和*B. gilchristii*的分子检测。虽然已有研究报道使用实时荧光定量PCR来鉴定培养物、支气管灌洗液、支气管肺泡灌洗液、胸水、痰和血液中的皮炎芽生菌和*B. gilchristii*[99-100],但大多数试验仍用石蜡包埋的组织来进行检测。

3. 球孢子菌病 对分离菌[101]进行各种PCR检测都能达到非常高的敏感性和特异性。最近,FDA批准了一种基于PCR的检测方法,用于检测临床样本中的球孢子菌(GeneSTAT. MDx; DxNA LLC, St. George, UT)。虽然使用临床标本进行PCR检测的敏感性与培养的敏感性接近(约为50%)[101-102],但截至目前,这类研究鲜有发表。

4. 副球孢子菌病 到目前为止,对临床标本

中巴西副球孢子菌检测试验的开发和评估试验的数量都非常有限[103]。*gp43* 和 rRNA 基因是首选的靶位序列。一种将巴西副球孢子菌 DNA 中 ITS-1 区作为靶位的实时荧光定量 PCR 方法在培养物和临床标本检测中得到应用。虽然这些分子检测试验评估的患者数量很少,但作者报道了100%的敏感性和特异性[104]。在一个检测感染和未感染小鼠肺组织匀浆中巴西副球孢子菌 DNA 的研究中,使用巢式 PCR 的方法对*gp43* 免疫原基因进行检测,敏感性为91%[105]。用一种基于5′核苷酸的荧光探针检测技术对编码*gp43* 抗原的基因序列进行检测,至少可检测这段 DNA 序列的10个拷贝[106]。

5. 不育大孢子菌病 在1例确诊为不育大孢子菌病的患者的支气管肺泡灌洗液中,使用泛真菌(panfungal)PCR 的技术对核糖体 ITS-1 和 ITS-2 区进行分析,检测出了新月伊蒙菌[107]。然而,迄今为止,对这些生物体的 PCR 检测还很有限。

6. Emergomycosis 目前,还没有对临床样本的分子检测方法,需要先培养后进行测序的分子鉴定。

七、分离程序

(一)生物安全

往往一个很轻微打开培养皿盖子的动作就足以使大量的分生孢子释放到空气中,所以推荐使用螺旋盖的试管进行此类真菌的培养或对培养皿进行密封。若丢弃一个生长了真菌的培养皿,数以百万计的分生孢子会释放出来。同时需要注意的是,在对实验动物注射的过程中发生意外注射到人体内,或对组织胞浆菌病、球孢子菌病或芽生菌病的患者进行尸检而引起的包括肉芽肿性表现的局部感染均有报道。

涉及球孢子菌、副球孢子菌、芽生菌、*Emergomyces*、伊蒙菌和组织胞浆菌等形成孢子的培养物和潜在含有这些病原菌的泥土或其他环境标本的一切操作均需在生物安全三级水平控制下的二级生物安全柜内进行,生物安全二级水平的安全措施和设施只建议处理临床标本和动物组织标本[108]。未知的具有透明菌丝的丝状真菌也应在二级生物安全柜内进行鉴定和操作,而不能在一个开放的实验室工作台上操作。尽管 *Emergomyces* 和伊蒙菌尚未被正式列为Ⅱ类或Ⅲ类危险病原体,但建议在二级生物安全柜中小心处理这些真菌的菌丝培养物,并使用个人防护设备,如 N95 口罩[52]。

(二)菌丝相的培养

总的来说,本章讨论的病原菌在25 ℃条件下使用普通的真菌培养基如沙氏葡萄糖琼脂和马铃薯葡萄糖琼脂培养基可以很容易地培养成菌丝相。37 ℃条件下培养可使多数双相真菌转化为酵母相。对临床标本如痰的培养应在培养基中加入抗生素(如氯霉素或庆大霉素)来防止细菌的污染。含放线菌酮的培养基可以抑制腐生真菌的生长,也可作为有效的鉴别工具用于真菌鉴定。很多土壤中的腐生真菌不能在含放线菌酮的培养基上生长,在37 ℃生长不良或在37 ℃不能转化为酵母相。螺旋盖的试管斜面培养基比平皿培养基更适合培养双相真菌。如果使用平皿培养基,需将其密封以防止丝状菌的孢子释放到空气中,但最好使用透气的密封条如 Shrink Seals(Scientific Device Laboratory, Des Plaines, IL)。一般情况下,形成菌落需要3~7天,但组织胞浆菌和副球孢子菌的一些菌株需更长的培养时间,为4~6周。

(三)酵母相的培养

在37 ℃合适的培养基条件下组织胞浆菌、芽生菌和副球孢子菌可以转化为酵母相。在人体体温条件下,*Emergomyces* 菌落为酵母样:小、奶油色至光滑的灰褐色,聚集成堆[3]。

1. 荚膜组织胞浆菌 荚膜组织胞浆菌在营养丰富的培养基如脑心浸液(brain heart infusion agar,BHI)琼脂或含血的脑心浸液(BHI with blood,BHIB)琼脂上可转化为酵母相。平皿或斜面培养基需在37 ℃需氧条件下至少培养4周。

2. 芽生菌 皮炎芽生菌和 *B. gilchristii* 可在37 ℃需氧条件下于营养丰富的培养基如 BHI 琼脂、BHIB 琼脂、Pine 培养基或 Kelley 琼脂中转化为酵母相。通常1周内可见酵母的生长,但培养基至少要放置4周后才能丢弃。小芽生菌在植物蛋白胨酵母提取物琼脂、BHI 或 BHIB 体外培养可产生不育大孢子。

3. 副球孢子菌 在 37 ℃条件下 BHI 琼脂、Pine 培养基或 Kelley 琼脂中培养,副球孢子菌可转化为酵母相。菌体生长很慢,平皿或斜面培养基至少需放置 4 周。

4. 伊蒙菌 新月伊蒙菌在 37～40 ℃植物蛋白胨酵母提取物琼脂、BHI 琼脂或 BHIB 琼脂上培养可产生不育大孢子。

5. *Emergomyces* 菌 *Es. pasteurianus* 在 37 ℃条件下 BHI 琼脂中培养 10 天左右可产生酵母样细胞。最近南非发现的一种 *Emergomyces* 菌,虽然在 37 ℃ BHI 琼脂上转种培养或单一菌落传代培养后经过 10～14 天形成了酵母相,但是在 37～40 ℃条件下不产生不育大孢子[51]。

八、鉴定

通常情况下,可以通过菌株的特点和分子方法对这些双相真菌进行鉴定,如典型的形态学特征、酵母相的转化、在条件允许的情况下使用 DNA 探针和(或)DNA 序列分析的方法。对怀疑为双相真菌的菌株不能使用玻片培养(小培养)的方法进行鉴定,因有吸入传染性孢子而导致实验室工作人员感染的风险。

(一)荚膜组织胞浆菌

在 25 ℃条件下培养可形成菌丝相。菌落最初呈白色或浅棕色,这 2 种颜色类型的菌株可分离自同一个患者,但最终浅棕色类型的菌落会转变成白色。棕色菌落通常比白色菌落产生更多典型的有结节状凸起的大分生孢子。传代培养后,只有约 30%的大分生孢子形成结节状凸起。荚膜组织胞浆菌的新鲜培养物中含有大量的小分生孢子。经过反复传代,大分生孢子和小分生孢子可能都会消失。由于真正的荚膜组织胞浆菌是不产大小分生孢子的,因此,对荚膜组织胞浆菌的鉴定不需要根据是否存在大小分生孢子来判断。一种名为瘤孢菌属(*Sepedonium*)的腐生真菌和与其相关的 *Renispora flavissima* 也可产生类似的大分生孢子,但不产生小分生孢子。对荚膜组织胞浆菌进行鉴定可以依据其双相性和在腐生菌抑制琼脂上可以生长的特性。

一旦识别出荚膜组织胞浆菌形态学特征,就可以通过诱导可疑菌的菌丝相转化为酵母相来进行印证。将菌株转种于 BHI 或 BHIB 琼脂上,在 37 ℃条件下培养至少 7～10 天,菌丝细胞可以直接出芽或膨大,也可形成随后才出芽的过渡性细胞,小分生孢子可转化为芽生酵母细胞。单次的传代很少能完全转化,需要在新鲜的 BHI 或 BHIB 培养基上多次传代。酵母相为白色、光滑、酵母样菌落,镜下可见椭圆形出芽的酵母细胞,大小为(1～3) μm×(3～5) μm。芽生孢子与母细胞连接的基底较窄,这一点与皮炎芽生菌有所不同。

快速探针检测(The AccuProbe test)(Gen-Probe, San Diego, CA)也可用于荚膜组织胞浆菌的鉴定,这个试验需要生长活跃的菌落,菌丝相不能超过 4 周,酵母相不能超过 1 周,固体培养或液体培养均可。这种检测方法是利用一台光度计在相对光单位下对 DNA-RNA 的特异性杂交结构进行定量分析,相对光单位数值大于 50 000 被认为是阳性。在荚膜组织胞浆菌鉴定中,此试验在很大程度上取代了外抗原检测。虽然在检测与阿耶罗霉科有遗传相关性的菌株时会产生假阳性[112],但一些研究显示,这个试验有较高的敏感性和特异性[109-111]。检测荚膜组织胞浆菌外抗原商业化的试剂盒可从 IMMY 公司获得。非洲组织胞浆菌与其他组织胞浆菌有相似的菌落形态,快速探针检测结果也为阳性[111],但组织病理学检查可将其区分开来。

(二)芽生菌

在 25～30 ℃,皮炎芽生菌和 *B. gilchristii* 菌落可形成不同形态,2～3 天可见绒毛状白色菌落,随着缓慢的生长,可形成光滑、棕褐色、不产孢的菌落。镜下可见椭圆形或梨形的小分生孢子,通常胞壁光滑,沿菌丝的短侧或末端分支生长。皮炎芽生菌和 *B. gilchristii* 在含放线菌酮的培养基中也较易生长。一些真菌的分生孢子如透明丝孢霉中的尖端赛多孢菌(*Scedosporium apiospermum*)、金孢子菌(*Chrysosporium*)的一些种及红色毛癣菌(*Trichophyton rubrum*),它们的形态与芽生菌的分生孢子相似,容易混淆,但这些真菌或在 37 ℃不能生长(金孢子菌的某些种),或在 37 ℃依然为丝状菌(尖端赛多孢菌和红色毛癣菌)。

能转化为酵母相可作为鉴定的手段。在

37 ℃条件下 BHI 琼脂、BHIB 琼脂、Pine 培养基或 Kelley 培养基上孵育，皮炎芽生菌和 *B. gilchristii* 通常较易转化为酵母相。酵母细胞透明、光滑、壁厚、直径 8～15 μm，芽生孢子与母体细胞通过宽大的基底相连，基底直径可达 4～5 μm。虽然偶尔有些分离株需几周的时间才能转化为酵母相，但多数能在 2～3 天内完成转化。小芽生菌在 37 ℃条件下产生菌丝，在 40 ℃条件下产生较小的不育大孢子（直径 8～20 μm）。在 25 ℃下，小芽生菌和新月伊蒙菌在形态和外观上不易区分。

快速探针检测也可用于芽生菌的鉴定，但巴西副球孢子菌[113]和透明孢小裸囊壳菌（*Gymnascella hyalinospora*）会产生假阳性结果，因此，必须小心区分这些真菌。对芽生菌外抗原进行检测的商品化试剂盒可从 IMMY 公司获得。

（三）球孢子菌

在 25～30 ℃条件下，球孢子菌可形成不同的菌落形态，可以是湿润、光滑、浅灰色的菌落，也可以是丰富的羊毛状白色菌落，成熟后可变为棕褐色甚至红色[114]。镜下可见细的有隔菌丝，可繁殖的（产孢的）菌丝通常呈直角分枝，关节孢子呈透明、单细胞、短的、圆柱形到筒形、细胞壁中等厚度且光滑的形态，直径（2～8）μm×（3～5）μm。关节孢子与壁薄、中空的孢间连接细胞交替相连成链，成熟后孢间连接细胞降解后释放出关节孢子，关节孢子两端会带有孢间连接细胞的残余而呈现出褶皱样。球孢子菌在含放线菌酮的培养基中生长良好，这也有助和与其相似的土壤中腐生菌如畸枝霉属（*Malbranchea*）的菌种相鉴别。由于菌丝老化后细胞质会收缩，可呈现出易被误认为关节孢子的外观，因此区分真正交替的关节孢子与老化的菌丝也非常重要。与老化的菌丝不同，真正的关节孢子链最终破裂后会释放出关节孢子。从形态学上区别球孢子菌属的 2 个种是比较困难的。

在 37 ℃体外培养时，可产生小球状体/内生包子。在 37～40 ℃合适的培养基和较高浓度的 CO_2 培养条件下，菌株可产生小球状体，但这一过程很少出现在常规的临床分离株中。

快速探针检测可用于确认疑为球孢子菌的菌株。虽然使用甲醛对菌株预处理可能会导致假阴性结果[115]，但此试验仍有较高的敏感性和特异性。该试验不能区分球孢子菌属的 2 个种。

（四）副球孢子菌

在 25～30 ℃培养条件下菌落生长较慢，可形成不同的菌落形态，可以是光滑、皮革样、褐色、有成簇的气生菌丝的扁平菌落，也可以是有褶皱、折叠的羊毛状菌落，再或是白色到米黄色的绒毛状菌落。菌落形态与皮炎芽生菌相似。大多数菌株经过长时间的培养也不产生分生孢子。

37 ℃条件下在营养丰富的 BHI、Pine 或 Kelley 培养基上可形成有褶皱（脑回样）的酵母样菌落，镜下可见菌丝与酵母细胞相交结。其转化为酵母相的速度也非常缓慢。酵母细胞直径 2～30 μm，大多椭圆形或不规则形状，典型的形态为母体细胞表面环绕着许多细颈、圆形的出芽，与舵轮或水手轮的外形相似，其细胞壁比皮炎芽生菌酵母细胞薄，也没有宽基底的出芽。

一般通过其双相性特性进行鉴定。目前尚无针对巴西副球孢子菌的商品化 DNA 探针。对皮炎芽生菌的快速探针检测与巴西副球孢子菌会产生交叉反应[111]，因此，在应用此试验时需要注意，阳性结果可能实际为巴西副球孢子菌。生长缓慢、不产孢的特点可与皮炎芽生菌进行区别。

（五）伊蒙菌

在 25 ℃，新月伊蒙菌形成光滑（蜡样）、无色的菌落，一段时间后可形成淡黄到白色的气生菌丝，一些菌株形成淡黄色至灰橙色的气生菌丝，菌落上常形成光滑的和成簇的菌丝体交替的现象，菌落背面浅灰色到灰褐色。镜下可见分枝分隔的菌丝。在马铃薯葡萄糖琼脂或麦片琼脂培养基上可提高产孢量，在菌丝的两侧或直角分枝的短茎上产生大量的分生孢子，每个茎的顶端会产生一个分生孢子，有时分枝末端膨大，产生 1～3 个脊柱样二级镶嵌体，依次形成花瓣样排列的次级分生孢子[116]。分生孢子可为圆形、椭圆形或梨形，直径（2～4）μm×（3～5）μm，分生孢子壁光滑，但老化后可变粗糙。25℃条件下从菌落形态和镜下形态上较难对小芽生菌和新月伊蒙菌进行区分。

在 37 ℃条件下 BHI 或蛋白胨酵母提取物琼脂上，新月伊蒙菌不产生菌丝，但形成较大的不育

大孢子(直径 20～140 μm)。

(六)Emergomyces 菌

Es. pasteurianus 在 25 ℃条件下与新月伊蒙菌和小芽生菌有相似的特征，在 37 ℃条件下 BHIB 培养基上可形成奶油状光滑的菌落，产生椭圆形或柠檬形的、窄基底出芽的酵母细胞，直径 2～4 μm。菌落呈光滑奶油状，该菌无论在体内还是在体外均不产生不育大孢子[117]。由于 *Emergomyces* 属是最近才被提出及描述的，所以现在就对其 5 个菌种(*Es. pasteurianus*、*Es. africanus*、*Es. orientalis*、*Es. canadensis* 和 *Es. europaeus*)中的每一个的识别给出一般性的指导还为时过早。

九、分型

通常，分型系统用于对分离菌株和其隐形种进行地理差异的比较。在一些菌属中，从同一个地理区域分离的不同菌株可显示出多态性。

(一)荚膜组织胞浆菌

前面提到过，荚膜组织胞浆菌至少可分为 8 个进化枝[6]。这种分型系统即可把未知菌株归类到全世界范围的主要地理分群中。为进一步划定这些菌株，基于酵母相特异性核酸基因 *yps*-3 和(或)线粒体 DNA 探针的限制性片段长度多态性(restriction fragment length polymorphism, RFLP)分型技术、随机扩增多态性 DNA(random amplified polymorphic DNA-based, RAPD)技术和基于 ITS 的分型技术被应用于一些研究中[118]。这些研究表明，分离自特定地理位置不同个体的分离株存在相当多的多态性[118]，例如，从巴西的动物和土壤中分离的菌株呈现出不同的亚型[119]，从巴西的患者中分离到的菌株与从美国患者中分离到的菌株相比，存在不同的 ITS 和 *yps*-3 亚型，这些亚型在美国患者中还未发现过，这与皮肤黏膜组织胞浆菌病在巴西比在美国更常见有关[120]。最近有一项研究通过分析巴西 51 例分离自环境、动物和人的菌株，调查了荚膜组织胞浆菌流行病学情况，并对多种分型方法进行了比较，研究显示，M13 PCR 指纹图谱和 PCR-RFLP 分析的结果非常相近，可将这些菌株归入到 3 个主要的群内[121]。最近发表了遗传标记在组织胞浆菌病分子流行病学中的应用[122]。

(二)芽生菌

在一项基于多种 rRNA 基因探针的 RFLP 分型技术的研究中，对 59 株分离自美国、印度和非洲的芽生菌进行分析，确定了 3 个主要的群，使用随机扩增多态性 DNA 指纹图谱技术对这些群进一步分类，每群又分为 5 型、15 型和 12 型，这些型与菌株的地理起源相关[123]。有趣的是，研究结果显示，从暴发过芽生菌病的鹰河(Eagle River, WI)土壤中分离的菌株并非为引起疾病暴发的菌株。一项针对于菌株 *BAD*-1 毒力基因上游启动子序列的研究显示，这一启动子区域存在大量的插入序列，从而也揭示了更多的基因多态性[124]。最近对该属的分类法提出了一项修改，其中一些以前可能被鉴定为伊蒙菌属的菌株现在被归类为芽生菌属[3]。小芽生菌分离株被分为两组，一组分离自北美大草原，另外一组分离自美国西南部沙漠地区或意大利。

(三)球孢子菌

在对分离自委内瑞拉、墨西哥和巴西的大量样本使用一组 9 个微卫星标记的方法进行研究时发现，球孢子菌可分为 2 个主要的进化枝，分别对应着 2 个菌种，粗球孢子菌和波萨达斯球孢子菌[18]。通过对等位基因任意的 17 个固定位点进行分析，可将粗球孢子菌(加利福尼亚群)或波萨达斯球孢子菌(非加利福尼亚群)进行分型[125]。应用微卫星分型技术对 121 例源自亚利桑那州的临床分离株进行分析，结果显示，亚利桑那州的球孢子菌病与此地区主要的波萨达斯球孢子菌菌株无关[126]。最近，利用全基因组测序的工作证实了波萨达斯球孢子菌是这两个菌种中较古老的一个，并提供了亚利桑那州不同地理分枝的证据[19]。

(四)副球孢子菌

对 8 个位点的多位点序列分析表明，巴西副球孢子菌至少可分为 3 个不同的种[21]。有几个课题组把编码一种主要的糖蛋白抗原的 *gp*43 基因作为分型的靶位来进行研究。在早期的研究中，为了区分一组分离自人类的巴西副球孢子菌是导致慢性疾病还是急性疾病，使用了微卫星序列作

为标志物进行比较[127]，但研究者没有观察到任何与急性或慢性疾病相关的菌株聚类现象。

(五)伊蒙菌

基于 ITS 序列分析，新月伊蒙菌分为 2 个有亲缘性的组，根据获得菌株的大陆位置命名为：北美组和欧亚组[1]。

(六)*Emergomyces* 菌

多位点序列分型(例如，使用来自核糖体 DNA 大亚单位、ITS、β-微管蛋白和其他 2 个保守基因的序列)的方法被发现有助于区分 *Emergomyces* 内的组[3,51]。

十、血清学试验

(一)组织胞浆菌病

血清学试验在对不同型别荚膜组织胞浆菌感染的快速诊断中起到重要作用，尤其对慢性肺组织胞浆菌病和播散性组织胞浆菌病的患者有更大价值[128]。在已有的不同方法中，免疫扩散(immunodiffusion，ID)试验、补体结合(complement fixation，CF)试验和乳胶凝集(latex agglutination，LA)试验应用最为广泛。这些试验中主要用到的抗原是组织胞浆菌素(一种菌丝相肉汤培养物的可溶性过滤液)。组织胞浆菌素含有荚膜组织胞浆菌种特异性 H 抗原、M 抗原和 C 抗原。H 抗原是一种 β-葡萄糖苷酶，其抗体可在组织胞浆菌病的急性期时形成；M 抗原是一种触酶，其抗体可在疾病的全过程产生；H 和 M 抗原曾经被认为是检测抗荚膜组织胞浆菌抗体的特异性蛋白，然而后来发现 M 抗原并非特异性的，除非将其去糖基化。

ID 试验是一种定性的方法，通过测定反应沉淀物来检测组织胞浆菌素中 H 和 M 糖蛋白抗原，血清和脑脊液都可进行检测。若患者在感染急性期检测血清的结果为阴性，应在 3～4 周后再次进行检测。ID 试验的试剂和试剂盒可从 Gibson Laboratories(Lexington，KY)、IMMY 和 Meridian Bioscience(Cincinnati，OH)获得。商品化的试剂盒包括含有荚膜组织胞浆菌 H 和 M 抗原的菌丝相培养物过滤液、含有 H 和 M 抗体的阳性质控血清和 ID 反应板。每次试验时均需用阳性质控血清和 H、M 抗原反应来进行质量控制。ID 试验是有效的筛选试验，也可作为 CF 试验的补充，与 CF 试验相比，它具有较高的特异性，但敏感性较低。

CF 试验是一种定量试验，采用了 2 种抗原：荚膜组织胞浆菌素和一种被乙汞硫代水杨酸钠(merthiolate)灭活的完整的荚膜组织胞浆菌酵母细胞悬液，与荚膜组织胞浆菌素相比，后者具有更高的敏感性(80% *vs.* 20%)，但特异性较低(90% *vs.* 99%)。血清、胸水和脑脊液均可用于 CF 试验。若患者在急性感染期检测血清的结果为阴性，应在 3～4 周后再次进行检测。目前尚无商品化的试剂，但抗原、抗血清和其他试剂可以从厂商购买(如 IMMY 和 Meridian)。每次进行 CF 试验时，均需做阴性质控血清和阳性质控血清的对照，阳性质控血清取自于组织胞浆菌病患者，对同源性抗原的 CF 滴度应在 1∶32 及以上。

最近报道了一种使用经高碘酸盐(metaperiodate)处理纯化的组织胞浆菌素作为抗原来检测患者荚膜组织胞浆菌抗体的 ELISA 方法，在非 HIV 患者急性感染、慢性感染和播散性感染中的敏感性分别为 100%、90% 和 89%，在 HIV 患者播散性感染中的敏感性为 86%，在纵隔组织胞浆菌病患者中敏感性可达 100%[99]，目前，此试验尚未商品化。

用组织胞浆菌素作为抗原的 LA 试验有商品化试剂(LA-Histo antibody system；IMMY)。此试验为检测 IgM 抗体的半定量方法，主要用于急性组织胞浆菌病的初步诊断，对慢性感染诊断的意义不大。一种检测 IgM 和 IgG 抗体的 EIA (MiraVista)方法也被发现有助于提高组织胞浆菌脑膜炎诊断试验的敏感性[129]。

(二)芽生菌病

在过去的 20 年里，芽生菌病的血清学试验已经取得了实质性的进步，但目前的血清学试验对于芽生菌病的确诊并没有帮助。过去的研究主要集中在 2 种纯化的皮炎芽生菌表面抗原的应用上，一种称为 A 抗原，另一种称为 WI-1 抗原。这 2 种抗原分子是皮炎芽生菌酵母相自溶所释放出来的，可从培养过滤液中回收。它们在免疫学方面非常相似，但 WI-1 是一种 120 kDa 大小的未糖基化的蛋白，而 A 抗原是一种 135 kDa 大小的糖基化蛋白[130]。

尽管如此，血清学试验检测芽生菌病的敏感性和特异性依然较低。最有效的血清学试验是ID试验，可以检测皮炎芽生菌A抗原的抗体，相对而言有较高的特异性，但敏感性较低（28%～64%）[131]。若患者在急性感染期检测血清的结果为阴性，应在3～4周后再次进行检测。

对CF试验也进行了相应的评估，但其显示了更低的敏感性和特异性（9%～43%）[132]。ID试验的试剂和试剂盒可从Gibson，MiraVista和IMMY获得。商品化试剂盒内包括纯化的皮炎芽生菌A抗原、含A抗体的阳性质控血清和ID反应板。每次试验均需同时做阳性质控血清的对照，其与同源的参考抗原在反应后应出现A沉淀素的线。

（三）球孢子菌病

尽管已开展一些敏感性较高的试验如EIA，但ID和CF试验依然是球孢子菌病血清学诊断最可靠的方法。这些试验中所用到的抗原主要是球孢子菌素，一种菌丝相肉汤培养后获得的可溶性滤液。

ID试验通过同时使用加热和不加热处理的抗原，可在一块反应板上实现对IgM和IgG抗体同时进行检测。试管沉淀免疫扩散抗体检测试验（immunodiffusion tube precipitin，IDTP）应用加热的球孢子菌素作为抗原来检测IgM，这种方法获得的结果可与传统的试管沉淀试验相媲美，在感染的早期诊断中最有应用价值。免疫扩散补体结合试验（immunodiffusion complement fixation，IDCF）使用不加热的球孢子菌素检测IgG抗体，与CF试验得出的结果具有可比性（见下文），其敏感性虽比CF试验低，但特异性高于CF试验[133]。商品化试剂盒可从Gibson，IMMY和Meridian获得，试剂盒内包括不加热和加热处理的球孢子菌素抗原、含有IgM或IgG抗体的阳性质控血清和ID反应板。实验前将血清10倍浓缩可提高IDTP和IDCF试验的敏感性。每次试验均需同时做阳性质控血清的对照，其与同源的参考抗原在反应后可出现一条沉淀线。ID试验可用于标本的初筛，如果出现阳性，再加做其他的试验。

CF试验用不加热的球孢子菌素来检测IgG抗体，是一种敏感性较高的定量方法，此试验最大的缺点是费时费力，对操作者的经验和能力要求很高，目前尚无商品化试剂盒，但可从几家公司（如IMMY和Meridian）获得“科研型”试剂。每次试验均需同时做阴性质控血清和阳性质控血清的对照，阳性质控血清是球孢子菌病（滴度≥1∶32）的患者血清。血清样本中可能存在抗补体活性成分，可继而用ID试验解决这个问题。除外血清标本，CF试验还可以使用脑脊液、胸水或关节液标本。

一种用加热的球孢子菌素作为抗原的乳胶凝集定性试验试剂盒可从几家公司购买到（如IMMY的LA-Cocci antibody system，Meridian的Coccidioides latex agglutination system）。此类试验操作简单、快速，但假阳性率高于IDTP和（或）CF试验，不推荐用于脑脊液标本的检测，因可出现假阳性反应[134]。

Premier Coccidioides EIA（Meridian）是一个定性检测血清或脑脊液标本中IgM和IgG抗体的试验，此试验中使用的抗原是纯化的IDTP和CF试验抗原混合物。在检测一些芽生菌病患者和需鉴别诊断的患者血清时发现，此试验可出现假阳性反应。目前，EIA试验常用于“初筛”，如果出现阳性结果，需用IDTP和IDCF试验来进行确认[135]。最近还开发了具有良好敏感性的其他的EIA（MiraVista）测试，但该测试的特异性较ID法低[136]。

（四）副球孢子菌病

ID试验和CF试验是诊断副球孢子菌病最常用的血清学试验，但其他试验如ELISA、对流免疫电泳（counter immunoelectrophoresis）、斑点印迹（dot blot）和免疫印迹（immunoblotting）等也有应用[137]。ID试验可检测出90%以上患者血液中的循环抗体，其阳性结果可用于疾病诊断。CF试验可用于对患者治疗效果更精确的评估，但荚膜组织胞浆菌抗原可与其发生交叉反应。上述试验中所用的抗原主要来源于巴西副球孢子菌的菌丝相或酵母相肉汤培养物的过滤液，其中主要的诊断性抗原是一种43 kDa大小的糖蛋白。与培养物过滤液提取的抗原相比，细胞壁上的抗原诊断价值较低，很大程度上是因为细胞壁上的主要成分半乳甘露聚糖会产生交叉反应[137]。商品化的菌丝相培养物过滤液提取抗原可以从IMMY公司获得，但仅限于科研使用，目前尚无商品化的试剂

盒。CF试验使用的是酵母相培养物过滤液提取的抗原，尚无商品化试剂和试剂盒。

在血清学诊断方面的提高包括检测抗体与化学合成和(或)重组的巴西副球孢子菌蛋白抗原的结合，尤其是gp43、pb27和87 kDa大小的热休克蛋白。将2个重组蛋白抗原联合使用可提高检测的敏感性(92%)和特异性(88%)[138-139]。通过双相免疫扩散法发现，由巴西副球孢子菌引起的副球孢子菌病患者的血清不能识别卢茨副球孢子菌所含的抗原，与此不同，来自于卢茨副球孢子菌引起的副球孢子菌病患者的血清能够识别两种抗原(卢茨副球孢子菌和巴西副球孢子菌)，表明卢茨副球孢子菌在抗原上更为复杂，不但具有菌种特异性抗原，也与巴西副球孢子菌具有相同的抗原[140]。

(五)不育大孢子菌病和Emergomycosis

尽管正在积极研究不同的方法，但目前尚无对不育大孢子菌病和Emergomycosis进行诊断的血清学试验。

十一、抗菌药物敏感性试验

对组织胞浆菌、芽生菌、*Emergomyces*、球孢子菌和副球孢子菌确定的治疗药物选择有两性霉素B和三唑类药物如伏立康唑、泊沙康唑、伊曲康唑和氟康唑。对于新的三唑类药物泊沙康唑，尽管在某些情况下似乎是有效的替代药物，但对于其治疗地方性真菌的临床数据有限[141]。棘白菌素类药物对地方性真菌的治疗作用有限，不能使用单药治疗。双相真菌的体外抗菌药物敏感性试验尚未标准化，对这些菌株的敏感性折点也未建立[142]。表125-1列出了文献报道的这些双相真菌的体外药物敏感性和所研究的抗真菌药物，试验操作是依据CLSI文件M38(针对丝状真菌)[142]和M27(针对酵母菌)[143]进行的。一些病例报道了氟康唑用于组织胞浆菌病和球孢子菌病治疗的失败，这与菌株对氟康唑的MIC≥64 μg/ml有一定关系，但伊曲康唑依然有效[144-145]。

表125-1　双相真菌对抗真菌药的体外敏感性[a]

真菌名称	抗真菌药	MIC范围(μg/ml)	MIC_{90}范围(μg/ml)	参考文献
皮炎芽生菌	两性霉素B	≤0.03~1	0.5	155-157
	氟康唑	1~64	NR	158
	伊曲康唑	≤0.03~4	0.125	155-158
	泊沙康唑	≤0.03~1	NR	158,159
	伏立康唑	≤0.03~16	0.25	155-157
	艾沙康唑	0.5~4	NR	158
	阿尼芬净	2~8	NR	159
	卡泊芬净	0.5~8	NR	159
球孢子菌属	两性霉素B	0.125~4	0.5~1	156,157,160,161
	氟康唑	2~>64	64	157,160,161
	伊曲康唑	0.125~16	1	156,157,161
	泊沙康唑	0.06~16	1	158,161,162
	伏立康唑	≤0.03~8	0.25	156-158,161
	艾沙康唑	0.125~1	0.5	158
	卡泊芬净	8~64	32	160
荚膜组织胞浆菌	两性霉素B	≤0.03~2	0.25	155-157
	氟康唑	≤0.125~64	NR	49
	伊曲康唑	≤0.03~8	0.06	155-157
	泊沙康唑	≤0.03~2	NR	158,159
	伏立康唑	≤0.03~2	0.25	50,155,156

（续 表）

真菌名称	抗真菌药	MIC 范围（μg/ml）	MIC_{90} 范围（μg/ml）	参考文献
	艾沙康唑	0.125～2	2	158
	阿尼芬净	2～4	NR	159
	卡泊芬净	0.5～4	NR	159
巴西副球孢子菌	两性霉素 B	0.125～4	NR	157
	氟康唑	≤0.125～64	NR	157
	伊曲康唑	≤0.03～1	NR	157
	伏立康唑	≤0.03～2	NR	157
	艾沙康唑	NR	NR	NR

注：[a] *Emergomyces* 和伊蒙菌的药敏试验有限，到目前为止很少检测到分离株。NR. 未报道

十二、结果的评价、解释和报告

（一）组织胞浆菌病

可以通过对临床标本或分离菌株直接镜检确诊组织胞浆菌病，然而，荚膜组织胞浆菌分离与鉴定需 2～4 周的时间。

抗原检测是对组织胞浆菌病其他诊断方法的补充，尤其适用于有多种疾病的免疫功能低下患者，可在阳性培养物鉴定之前提供一个快速的诊断。组织胞浆菌多糖抗原（HPA）可自播散性组织胞浆菌病患者的血清、尿、脑脊液和支气管肺泡灌洗液标本中检出。对播散性组织胞浆菌病而言，抗原检测的敏感性在免疫功能低下的患者中比免疫功能正常的患者和有更严重疾病的患者中要高，尿中的抗原水平比血清中高，在 AIDS 患者伴有播散性组织胞浆菌病时，尿检测的敏感性为 81%～95%，血液检测的敏感性为 86%[146]，抗原检测的特异性约为 98%。组织胞浆菌脑膜炎患者的脑脊液也可检出抗原。

多数患者尿和血液中抗原水平会随着有效的治疗而降低，甚至低至不能检出[77]，治疗期间抗原浓度不降低可能预示治疗失败。对治疗有效且抗原水平下降的患者，如出现尿或血清中抗原水平的再次升高则提示疾病的复发。

检测组织胞浆菌抗体的乳胶凝集试验对诊断急性感染最为有效，暴露后的 2～3 周即可检出阳性结果。滴度 1:16 可推测感染，滴度≥1:32 是推测活动性感染或近期感染强有力的证据[110]。因乳胶凝集试验可出现假阳性，故结果需用 ID 试验进行确证。对单个标本中较低的滴度结果判断需谨慎，应在 4～6 周后再次采集标本进行检测。

在 ID 试验中，荚膜组织胞浆菌的 M 抗原是最早出现沉淀反应的（在暴露后 4～8 周），其可在多达 75%的急性组织胞浆菌病患者中检出，但其也可在几乎所有慢性肺部感染的患者和最近接受过荚膜组织胞浆菌素皮肤试验的人群中检出。与 H 抗原发生沉淀反应是活动性感染比较特异性的指标，但其只在不到 20%的病例中出现，H 抗原通常在感染最初的 6 个月内消失或存在非常少量，如果有，可在 M 抗原不出现沉淀时发现。不论其他血清学试验结果如何，若 H 抗原和 M 抗原均出现沉淀反应，则高度提示活动性组织胞浆菌病。

补体结合试验可用于诊断急性、慢性、播散性组织胞浆菌病和组织胞浆菌脑膜炎。在急性感染中，酵母相的抗体是最先出现（暴露后约 4 周）和在感染控制后最后消失的，组织胞浆菌素的抗体出现较晚且滴度比酵母相的抗体低。与此相反，在慢性组织胞浆菌病的患者中组织胞浆菌素的滴度通常较高。由于存在交叉反应，若对芽生菌病、球孢子菌病和其他真菌感染的患者血清进行 CF 试验，则结果很难解释。这种情况下，滴度一般在 1:32～1:8之间，主要是与酵母相抗原发生的反应，然而，在对许多经培养确证的播散性组织胞浆菌病患者的血清样本中，滴度也可在这一范围内。若与两种抗原中的任何一种进行 CF 试验其滴度≥1:8时，可推测为组织胞浆菌病。滴度≥1:32 且在一系列样本中存在滴度递增趋势即可为感染提供强有力的依据。

荚膜组织胞浆菌 CF 抗体滴度可随着感染的

有效治疗而降低，但在慢性进展性疾病患者中会增加。然而，评估患者预后或制订治疗方案时，需考虑临床和微生物学检查结果。在一些患者中，CF滴度在疾病治愈后缓慢下降且持续较长时间。与抗真菌药物治疗对抗体清除的影响一样，CF滴度的持续升高或波动的意义尚不明确[147]。

血清学试验在组织胞浆菌脑膜炎患者诊断中特别有意义，在特定的临床背景下，依据脑脊液标本对H抗原和M抗原出现的沉淀反应足以做出诊断，且此试验常常是唯一阳性的诊断试验。

(二)芽生菌病

尽管显微镜检查和培养仍然是诊断芽生菌病最灵敏的方法，但血清学试验也可提供有价值的信息，用皮炎芽生菌A抗原进行ID试验时，阳性结果对芽生菌病具有特异性和诊断价值[148]。然而，阴性的ID结果不能排除疾病的诊断，因为这种方法对不同感染类型检测的敏感性差异较大，局部感染约为30%，播散性芽生菌病约为90%。在确诊病例中，沉淀反应线数量减少或消失提示预后良好。

尽管最近的经验表明在临床实践中敏感性较低，但有报道显示，用尿标本进行芽生菌抗原检测，对播散性感染和肺部感染的敏感性分别为89%和100%[85]。然而，所有副球孢子菌病患者和96%的组织胞浆菌病患者尿中存在交叉反应的抗原[83]。

(三)球孢子菌病

虽然球孢子菌病确切的实验室诊断取决于显微镜检查和培养，但血清学试验在诊断和治疗中被证实还是有价值的。一个阳性的试管沉淀免疫扩散(IDTP)试验结果可提示急性球孢子菌病。高达75%的患者在球孢子菌病症状出现1周内可用IDTP试验检出IgM抗体，3周内90%的患者抗体阳性。脑脊液标本IDTP试验阳性可提示急性球孢子菌脑膜炎，但很少见。如果有患者出现IDTP试验阴性但CF试验阳性，应进行组织胞浆菌病或皮炎芽生菌病的微生物学或组织病理学检查。此外，如果患者有到疾病流行地区的旅行史，还应每隔3周抽血进行CF和ID试验来检查球孢子菌病、组织胞浆菌病和芽生菌病。

免疫扩散补体结合(IDCF)试验阳性结果可作为近期或慢性感染的推测依据，在出现症状后的2～6周内用IDCF试验通常可检测到IgG抗体。虽然IDCF试验一般不用作定量检测试验，但其可以进行定量检测。IDCF定量检测的滴度虽与CF试验的滴度不完全相同，但趋势是有可比性的。

乳胶凝集试验在检测急性感染方面比IDTP试验更灵敏，但特异性较低。因此，未稀释的血清若出现阳性检测结果需用ID和(或)CF试验来确证。

在感染4～12周后CF试验才可能出现阳性，但在慢性肺部感染或播散性感染的患者中，CF抗体会持续很长时间。在系列标本中出现滴度的升高或降低可提示疾病的加重或缓解，也可用于评估抗菌治疗的效果。CF试验中对球孢子菌素产生任何滴度都应考虑球孢子菌病。多数情况下，滴度与感染的程度是成比例的，在播散性球孢子菌病治疗过程中若CF试验滴度没有下降则提示治疗效果不佳[149]。滴度为1:2或1:4通常可预测早期感染、残余感染或脑膜感染，滴度>1:16时应考虑感染播散到呼吸道以外部位的可能[150]。60%以上播散性球孢子菌病患者CF试验的滴度>1:32。然而，在AIDS等免疫功能低下的患者中可能出现假阴性结果。临床表现符合球孢子菌病而血清CF试验阴性或滴度较低的患者，应间隔3～4周后重新测试。

脑脊液标本的CF试验是诊断球孢子菌脑膜炎常用的方法，也是对诊断唯一的且最有效的方法。

球孢子菌病的抗原检测不灵敏，通常不用于诊断。若对严重免疫功能低下患者高度怀疑合并球孢子菌病时，当其血清学抗体检测为阴性，则抗原检测可能有用[151]。

(四)副球孢子菌病

副球孢子菌病的确诊主要依赖于显微镜检查和培养，然而，从临床标本中对巴西副球孢子菌进行分离和鉴定至少需要4周的时间。

血清学试验可快速地对副球孢子菌病进行初步诊断，尤其对播散性副球孢子菌感染[137]。用酵母相培养物过滤液抗原进行的ID试验有很好的特异性，其在急、慢性肺部感染或播散性球孢子菌

病患者中的阳性率可达 65%～100%。用酵母相培养物过滤液抗原进行的 CF 试验特异性比 ID 试验低，与组织胞浆菌病可发生交叉反应。CF 试验滴度≥1∶8可作为副球孢子菌病初步诊断的证据。较低的 CF 试验滴度通常与局限性感染有关，而高滴度见于多发病灶的感染。CF 试验滴度降低提示治疗有效，滴度升高或波动提示预后不良。然而，有些报道显示 ID 试验和 CF 试验的结果与患者的临床状态相关性较差[152]。

特别是由于最近在该属分类特征方面的研究进展，目前正在努力寻找新的血清学标志物对副球孢子菌病进行诊断和监测[153]。

(五)不育大孢子菌病和 Emergomycosis

直接显微镜检查发现临床标本或其分离培养物中存在伊蒙菌或 *Emergomyces* 菌可确诊不育大孢子菌病和 Emergomycosis。目前没有可用的血清学试验。

参考文献请扫二维码查阅

第126章 毛癣菌属、小孢子菌属、表皮癣菌属和浅部真菌病的病原菌

ANDREW M. BORMAN, RICHARD C. SUMMERBELL

（福泉 译；付英梅、陆玲 审校）

一、分类学

目前，皮肤癣菌病的致病真菌及其近缘的非致病真菌被划分为子囊菌纲（Ascomycota）甲爪团囊目（Onygenales）[1]节皮菌科（Arthrodermataceae）的3个属：毛癣菌属（*Trichophyton*）、小孢子菌属（*Microsporum*）和表皮癣菌属（*Epidermophyton*）。这些属的命名是沿袭了它们无性型（无性繁殖状态）的名称。所有能够进行有性繁殖的皮肤癣菌，即能产生带有子囊和子囊孢子的子实体的皮肤癣菌在节皮菌属（*Arthroderma*）或奈尼兹皮真菌属（*Nannizzia*）[2]中都有其有性型名称。

作为生物学分子进化不断发展的一部分，真菌分类学正面临人们对种群遗传学深入认识的巨大影响[3]。皮肤癣菌的种间显示出2种不同的种群遗传学特征，它们的"种群宿主"[4]在动物学上分属于不同的纲、目、科[5-6][种群宿主是某种真菌常见的流行病学宿主，它有别于被临时感染但不会在固定种群间传播的"临时宿主"；例如，犬小孢子菌（*Microsporum canis*）的种群宿主是猫科动物，人经常被猫科携带者感染，但是却很少发生直接的人与人之间的传播，这使得人仅仅是一个临时宿主]。某些种的皮肤癣菌，包括以啮齿类、兔、猪、狗和猫科动物为种群宿主的真菌可能是有性繁殖的，这种有性繁殖仅发生在真菌离开宿主的情况下，例如，发生在与地面接触的毛发或其他角质碎屑上。其他真菌，尤其是那些以人、有蹄类、马科或鸟类为种群宿主的真菌，不具备适合其有性繁殖的土壤环境或反复感染宿主的能力，因此在实验室培养时这些真菌表现为无性繁殖状态或克隆性的。在这类真菌中，几乎每一个种在遗传学上都高度一致[7-9]，拥有单一的交配型[6,10]。很多种似乎从同一有性祖先进化而来，祖先发生了罕见而成功的转变，可以持续地传染新的动物宿主。在进化中出现的这些新克隆种群，因其动物宿主的变化产生了更强的筛选进化压力，使得这些种群的某些流行病学和表型特征得以加速进化。上述进化过程使真菌产生一些特有特征，以便于对这些真菌的种进行实验室鉴定。与此同时，系统发生分类学研究发现基本的细胞"管家基因"具有正常的进化率，于是更加倾向于和祖先种或姊妹种相似。这给真菌分类中种的概念带来很大的混淆。

真菌命名规则与新的分类学方法并行发展，产生了2013年1月1日生效的"一种真菌，一种名称"制度[11]。在这个系统下，似乎更倾向于采用临床上熟悉的无性型（毛癣菌属、小孢子菌属、表皮癣菌属）名称替代节皮菌属的名称来命名这群真菌。然而，最近对节皮菌科成员的模式菌株和参考菌株的多位点系统发育研究，在广泛支持早期系统发育的同时，也证明了毛癣菌是多源的[12]，将皮肤癣菌及其近缘的真菌划分为7个属。基于这种分类，目前毛癣菌属共有16种，表皮癣菌属1种，奈尼兹皮真菌属7种，小孢子菌属3种，冠癣菌属（*Lophophyton*）1种，帕氏杆菌属（*Paraphyton*）3种，节皮菌属21种。在这一分类中，几乎所有的亲人皮肤癣菌都保留在毛癣菌属和表皮癣菌属中，其中还包括几个经常与人类感染相关的亲动物种。相反，大多数亲土种和那些很少引起人类疾病的亲动物真菌被列入节皮菌属、冠癣菌属、帕氏杆菌属和奈尼兹皮真菌属。即使采用这样的

多位点方法，某些最近出现分歧的谱系也是被勉强地描绘出来的[例如，断发毛癣菌（*Trichophyton tonsurans*）和马毛癣菌（*Trichophyton equinum*）[13]]，建议需要结合生态、表型、生命周期和功能基因组学特征的多相的方法来全面验证所有物种并最终确定物种边界。此外，到目前为止，很有可能对亲土皮肤癣菌的研究还不够充分，这就增加了未来会出现许多额外的迄今为止尚未取样的分类群的可能性。值得注意的是，最近的蛋白质组学方法基本上支持同样的系统发育树，即之前提出的基于表型、临床和流行病学特征的系统发育树[13]。由于这些最近的分类建议在医学真菌学界的报告实践中没有被完全采用，本章对这类真菌正在进行的分类重组保留了相对保守的方法。表 126-1 中给出了迄今已被认可的物种名单，并在现有名称旁边给出了建议的新名称。收录了以前的无性型名称和长期使用的节皮菌属名称，以便于与早期文献进行比较。

二、流行病学和传播

皮肤癣菌属于能够侵入活体动物角质组织的亲角质真菌。根据它们的宿主偏好和自然栖息地把它们分成三类（表 126-2）[14]。亲人种大部分只感染人，很少感染动物。亲土的种是与土壤相关生物，土壤本身或土壤中的角质碎屑（比如，脱落的毛发或羽毛）是感染人类和其他动物的感染源。亲动物种基本上是除人类之外的哺乳动物的致病菌，少数情况下可感染鸟类；然而，动物和人之间的传播并不常见。理解这些种群的生态学分类对于确定感染源或许有帮助；例如，犬小孢子菌导致的人类感染经常是易感儿童与新收养的或流浪的小猫接触所致[15]。对临床标本中的皮肤癣菌进行鉴定，能够帮助控制可能由家庭宠物或其他驯化动物所引起的感染。并且，犬小孢子菌引起的头皮感染所需的治疗方案，与头癣的常见致病菌导致的感染是不同的。因此，正确鉴定病原菌种具有重要的作用。

一些皮肤癣菌，如红色毛癣菌（*Trichophyton rubrum*）是全球性分布的，而其他的菌种如同心毛癣菌（*Trichophyton concentricum*）是有地理局限性的[16]。同心毛癣菌仅发现于太平洋岛屿、东南亚和中南美的一些地区。然而，不能忽视皮肤癣菌通过人口流动而扩散到新的地理生态区域的能力。在英国，红色毛癣菌大范围入侵和奥杜盎小孢子菌（*Microsporum audouinii*）出现在乡村地区，可能分别与第一次和第二次世界大战期间军队从远东归国和儿童从主要城市的撤离有关。同样在英国，大规模的加勒比移民导致了断发毛癣菌重新成为头癣的优势致病菌[17]。因此，不能仅依据历史流行病学资料而掉以轻心。

亲人真菌一般通过人与人之间的亲密接触直接传播，或者通过共用的衣服、梳子、刷子、毛巾、床单等间接传播。头癣具有高传染性，并可以在家庭、机构或学校内迅速传播。股癣的传播与共用衣物、毛巾和卫生设施有关。足癣和甲癣的传播经常与共用淋浴、浴池或其他水设施有关，但可能依赖于环境和宿主因素的共同作用[18-19]。患慢性红色毛癣菌足癣可能具有常染色体显性易感基因[20]。

感染亲土壤的皮肤癣菌需要经土壤中的传染源传播到人或其他动物。据报道，感染暴发起始于被污染的土壤再通过人与人之间传播[21]。亲动物种的感染来自于动物（猫、狗、牲畜、实验动物等）与人的接触或通过接触污染物的间接传播。之后这些真菌可以在人之间进行有限的传播，尤其是在机构内部[22]。

三、临床意义

皮肤癣菌病（癣）通常表现为人类的角化组织（头发、指甲、皮肤等），其他哺乳动物和鸟类的真菌感染。与皮肤癣菌病类似的皮肤感染偶尔可由酵母菌引起，或者由不相关的丝状真菌引起，后者通常为腐生真菌或植物致病真菌；这些感染被称为机会性的表皮癣菌感染[19]。

只有少数传染性真菌能在人或动物宿主间直接传播，皮肤癣菌是其中的一类。这些真菌的传播一般通过在被感染的宿主组织中产生的分生孢子来实现。这些分生孢子可以通过皮肤直接接触，或接触含有游离的分生孢子、脱落皮屑或毛发的污染物传播。典型的污染物包括帽子、鞋、浴室地面、寝具、长期护理场所中护士的衣服、动物舍、筑巢材料和动物用来瘙痒的农场围栏桩。组织浸润通常仅限于皮肤；由于血清中的非特异性抑制因子[23]抑制真菌的角质化酶[24]、表皮角蛋白细胞形成的屏障[25]和其他免疫屏障[26-27]的作用，皮肤

表 126-1 临床分离的皮肤癣菌和类皮肤癣菌的重要特征

皮肤真菌的种类和数量(如果已知其有性型,所列名称即为有性名称)	提出的新名称[12]	生长速度	菌落特征	镜下形态	BCPMSG 培养基 pH 改变(7～10 天)	尿素酶试验(7 天)	毛发穿孔试验	其他特征
絮状表皮癣菌[a](*Epidermophyton floccosum*)	无改变	较快速	扁平,早期轻微颗粒状,很快变成白色绒毛状;沙色至橄榄棕色(图 126-18e);背面为灰色至淡黄色	大分生孢子一般有少于 6 个分隔,丰富,棒状、顶端钝圆(图 126-12);无小分生孢子形成,初期培养有大量厚壁孢子	碱性	阳性	阴性	侵入皮肤和指甲,很少侵入头发;无小分生孢子
奥杜盎小孢子菌[b](*Microsporum audouinii*)	无改变	较快速	扁平,薄绒毛状,背面鲑鱼白色,白褐色	大分生孢子少见,常呈喙状变形,中部收缩,并且有微量颗粒状(图 126-13);可能见泪滴状小分生孢子和气生分生孢子;梳状分支,常见尖细的顶端厚壁孢子	pH 值无改变或碱性	阴性	阴性	大米培养基中生长不良,可无棕色菌落生长,仅感染儿童,非洲多见
犬小孢子菌[a](*Microsporum canis*)[太田节皮菌(*Arthroderma otae*)]	无改变	迅速	扁平,薄绒毛状,白色到浅黄色(图 126-18g),背面黄色(白色罕见)	大分生孢子,壁厚,粗糙,喙状(图 126-14);小型分生孢子泪滴状	pH 值无改变;丰富的大分生孢子	阳性	阳性	在大米培养基上生长良好,黄色菌落;人类感染来源于猫、狗。犬小孢子菌中,变种可见变形扭曲的大分生孢子;来源于马的马小孢子菌(*Microsporum equinum*)表型罕见
库克小孢子复合体[b](*Microsporum cookei* complex),包括库克小孢子菌(*M. cookei*)[凯耶节皮菌(*Arthroderma cajetani*)]和奇异小孢子菌(*M. mirabile*)[奇异节皮菌(*Arthroderma mirabile*)]	所有物种都迁徙到帕氏杆菌属(*Paraphyton*)	较快速	颗粒状,绒毛状,背面酒红色	大分生孢子粗糙,壁厚,有细胞隔室而不是真正的横壁(图 126-15),小分生孢子泪滴形	pH 值无改变	阳性	阳性	目前致病依据不足;很少有病例报道
铁锈色小孢子菌[c](*Microsporum ferrugineum*)	无改变	缓慢	扁平,有皱褶,绒毛状,蜡状;背面和正面黄色,锈色或白色	无分生孢子,可见粗大直的竹节状菌丝和突出的隔膜	pH 值无改变	阴性	阴性	在 Lowenstein-Jensen 培养基上亮黄色菌落(与苏丹毛癣菌相比);仅出现在亚洲、非洲和东欧地区
鸡禽小孢子菌[c](*Microsporum gallinae*)	鸡小孢子菌(*Lophophyton gallinae*)	较快速	扁平,绒毛状,表面白色至粉红色,背面红色渗透到琼脂中	大分生孢子光滑或略微粗糙,近顶端常弯曲,有浓厚的细胞,有时略微粗糙;小分生孢子呈泪滴状	无数据	阴性	阴性	罕见,人类感染源于鸡,根据 Graser 等报道,认为可能是由格鲁比节皮菌(*A. grubyi*)无性繁殖而来[99]

（续 表）

皮肤真菌的种类和数量（如果已知其有性型，所列名称即为有性名称）	提出的新名称[12]	生长速度	菌落特征	镜下形态	BCPMSG 培养基 pH 改变（7～10 天）	尿素酶试验（7 天）	毛发穿孔试验	其他特征
石膏样小孢子菌复合体[a]（*Microsporum gypseum complex*）[石膏节皮菌（*Arthroderma gypseum*）、内弯节皮菌（*A. incurvatum*）、粉节皮菌（*A. fulvum*）和杜波西小孢子菌（*Microsporum duboisii*）]	所有物种都迁徙到奈尼兹皮真菌属（*Nannizzia*）	迅速	颗粒状，沙色，或有时亮肉桂色至玫瑰色；背面常浅灰至棕色	大分生孢子丰富，薄壁，纺锤形（两端锥形），粗糙，有多至 6 个分隔（图 126-16）；小分生孢子泪滴形，大多沿分枝菌丝生长（这一特点是总状小孢子菌的唯一特征）	pH 无改变	阳性	阳性	人接触土壤感染
微小小孢子菌[b]（*Microsporum nanum*）[钝圆节皮菌（*Arthroderma obtusum*）]	微小奈尼兹皮真菌属（*Nannizzia nana*）	较快速	粉末状，沙色；背面红褐色	大分生孢子粗糙，只有 1～3 个细胞长，细长，卵圆形或椭圆形	无数据	阳性	阳性	人类感染来源于猪；现在极少见
桃色小孢子菌[b]（*Microsporum persicolor*）[桃色节皮菌（*Arthroderma persicolor*）]	桃色奈尼兹皮真菌属（*Nannizzia persicolor*）	迅速	粉末状，沙色；背面淡黄色，有时呈玫瑰色	在常规 SDA 琼脂上，大分生孢子无生成或呈纺锤形（两端锥形），壁光滑；但在含盐（3% 或 5% NaCl）SDA 琼脂上多为常见的粗糙细胞壁（图 126-17）；梗上形成小分生孢子（必须在 5 天内检测）	pH 无改变	阳性	阳性	37 ℃体外生长很弱；在无糖 SDA 培养基上，菌落背面呈玫瑰色，酒红色，人类通过土壤接触感染（田鼠污染物）
早熟小孢子菌[b]（*Microsporum praecox*）	早熟奈尼兹皮真菌属（*Nannizzia Praecox*）	迅速	粉末状，沙色，背面黄色	同石膏样小孢子菌	pH 无改变	阳性	阴性	罕见
总状小孢子菌[c]（*Microsporum racemosum*）[总状节皮菌（*Arthroderma racemosum*）]	建议将其作为库克帕杆菌属（*Paraphyton cookei*）的兼性同义词	迅速	粉末状，沙色，背面红色	大分生孢子同石膏样小孢子菌；小分生孢子形成似葡萄串样的浓密分枝（总状花序）	pH 无改变	阳性	阳性	罕见
万氏小孢子菌[c]（*Microsporum vanbreuseghemii*）[格鲁比节皮菌（*Arthroderma grubyi*）]	鸡小孢子菌（*Lophophyton gallinae*）	迅速	粉末状，粉红或淡黄，背面乳白或黄色	大分生孢子粗糙，厚壁，柱状，常多于 8 个细胞长，有细胞隔室而不是横壁	无数据	阳性	阳性	罕见，根据 Graser 等[99]报道认为无性型可能是鸡禽小孢子菌不同流行病学和表型的同种

（续 表）

皮肤真菌的种类和数量(如果已知其有性型,所列名称即为有性名称)	提出的新名称[12]	生长速度	菌落特征	镜下形态	BCPMSG 培养基 pH 改变(7~10 天)	尿素酶试验(7 天)	毛发穿孔试验	其他特征
阿耶罗毛癣菌[b] (*Trichophyton ajelloi*) [钩状节皮菌(*Arthroderma uncinatum*)]	钩状节皮菌(*A. uncinatum*)	较快速	粉末状,使培养基颜色变为棕褐色至橙棕色;背面灰白色、棕色或暗紫色	大分生孢子厚壁,光滑,柱状,常多于 7 个细胞长,有细胞隔室而不是横壁(图 126-5)	无数据	阳性	阳性	不感染人类
同心毛癣菌[c] (*Trichophyton concentricum*)	无改变	缓慢	皱褶,浅棕色到红棕色,光滑的或短绒毛状	无大小分生孢子	无数据	阳性或阴性	阴性	仅见于患有典型叠瓦癣(*tinea imbricata*)的亚洲南岛语族土著人/尼西亚人或中南美土著人
马毛癣菌[b] (*Trichophyton equinum*)	无改变	较快速	扁平,绒毛状,表面奶油色,背面黄色至红棕色	大分生孢子罕见,柱状,棒状,壁光滑;小分生孢子丰富,花梗样集簇(前 5 天检测)	碱性	阳性	多数阴性少数阳性	人感染来源于马;分离自新西兰和澳大利亚的菌株,除发生变异外,均需要烟酸促进其生长
意瑞奈斯毛癣菌刺猬型[b] (*Trichophyton erinacei Hedgehog form*) [本海姆节皮菌(*Arthroderma benhamiae*)]	无改变	迅速	颗粒状,粉末状,正面奶黄色到浅黄色,背面黄色	大分生孢子罕见,棒状,光滑;小分生孢子丰富,近球形,大多致密聚集成簇;含有螺旋菌丝	碱性	阴性(欧洲/新西兰种)阳性(非洲种)	阳性	人感染常来源于刺猬及其污染物,因此,多数感染局限于饲养野生或宠物刺猬的地区
麦格尼毛癣菌[b] (*Trichophyton megninii*)	无改变	较快速	絮状,白色有时夹杂着玫瑰红色,背面红色至红褐色	大分生孢子罕见,铅笔形;小分生孢子泪滴形	碱性	阳性或弱阳性	阴性	在葡萄牙及附近地区流行,生长需要组氨酸,Graser 等[99]鉴定其为红色毛癣菌(*T. rubrum*)的一个亚型
须癣毛癣菌复合体(亲动物型)[a] [*T. mentagrophytes* complex(zoophilic)] 包括 *T. mentagrophytes sensu stricto*(之前的 *T. mentagrophytes var. quinckeanum*),动物源性的趾间毛癣菌(*Trichophyton interdigitale*)和本海姆节皮菌(*A. benhamiae*)[万博节皮菌(*Arthroderma vanbreuseghemii*),本海姆节皮菌(*A. benhamiae*)]的无性型毛癣菌属;也包括稀有物种 *Trichophyton eriotrephon* 和 *Trichophyton bullosum*	无改变,但现在提出将本海姆节皮菌的无性型毛癣菌属称为本海姆毛癣菌(*T. benhamiae*)	迅速	颗粒状,粉末状,表面奶黄色,浅黄色(图 126-18b),背面红褐色或灰白色	大分生孢子罕见,棒状,壁光滑;小分生孢子丰富,近似球形,多浓密成簇;可见螺旋状菌丝	碱性(弱碱性)	阳性	阳性	人类感染来源于啮齿动物或兔子。含 3% 或 5% NaCl 的 SGA 培养基可诱导产生大分生孢子(图 126-6)

(续 表)

皮肤真菌的种类和数量(如果已知其有性型,所列名称即为有性名称)	提出的新名称[12]	生长速度	菌落特征	镜下形态	BCPMSG 培养基 pH 改变(7～10 天)	尿素酶试验(7 天)	毛发穿孔试验	其他特征
须癣毛癣菌复合体(亲人型)[a] [*T. mentagrophytes* complex (anthropophilic)]包括人源性的趾间发毛癣菌(*T. interdigitale*)和本海姆节皮菌(*A. benhamiae*)[万博节皮菌(*A. vanbreuseghemii*),本海姆节皮(*A. benhamiae*)]的无性型毛癣菌属	无改变,但现在提出,将本海姆节皮菌的无性型毛癣菌属称为亲动物型本海姆毛癣菌(*T. benhamiae*)	迅速	粉末状或絮状,奶黄色,浅黄色或白色,背面红褐色	大分生孢子罕见,棒状,壁光滑;小分生孢子丰富,球形或泪滴形,圆形的小分生孢子密集成簇,水滴形周围有分枝稀疏的菌丝;有螺旋状菌丝,絮状的菌落罕见	碱性	阳性	阳性	含 3% 或 5% NaCl 的 SGA 培养基可诱导产生大分生孢子
须癣毛癣菌(*T. mentagrophytes*)[“结节”变种[b] 以前被称为克拉顿毛癣菌(*T. krajdenii*),现在是已知的趾间毛癣菌变种]	无改变	较慢	絮状,表面奶油色或白色,边缘黄色(图 126-18a),背面深黄色	大分生孢子罕见,小分生孢子多数为泪滴形,有时圆形;在基层菌丝中可见盘绕的黄色棒状菌丝和黄色颗粒;螺旋状菌丝少见	碱性	阳性	阳性	虽然经常在形态上非常不同,但目前为止该真菌与趾间毛癣菌(*T. interdigitale*)的其他亲人型分离株在遗传背景上并无明显不同
红色毛癣菌[a](全球变种)[*T. rubrum* (cosmopolitan variant)]	无改变	较慢	絮状,绒毛状,表面白色或红色(图 126-18c),背面典型的酒红色(图 126-18d),偶见黄色变种,细菌污染时呈微弱红色	大分生孢子罕见,铅笔状(图 126-8);小分生孢子泪滴形,丰富、稀少或无;常见横向菌丝突出	无 pH 值改变(14 天后变碱性)	阴性(非常微弱)	阴性	罕见产棕黑或黑色变种
红色毛癣菌(*T. rubrum*)[亚-非性变种[b],以前称为鲁比切克毛癣菌(*T. raubitschekii*)和 *T. fluviomuniense* 及无小分生孢子的康内毛癣菌(*T. kanei*)]	无改变	较慢	粉末状,短绒毛状,奶油至深红色,背面酒红色	大分生孢子丰富(图 126-7),棒形,有时似鼠尾样延伸;小分生孢子泪滴状,圆形;培养初期厚壁孢子丰富	无 pH 值改变(14 天后变碱性)	阳性	阴性	尽管通常在形态上与典型的红色毛癣菌截然不同,但目前为止它们之间的差异仅能用微卫星标记来识别;此菌常从上半身开始感染(体癣、股癣)
许兰毛癣菌[c](*T. schoenleinii*)	无改变	慢	脑回状,轻微绒毛状,灰白色	无分生孢子;可见“吊灯”或“钉头状的菌丝”	碱性	不定	阴性	罕见;与临床上特征性的“黄癣”损伤相关;在中亚和非洲的农村有报道
猴毛癣菌[b](*Trichophyton simii*)[猴节皮菌(*Arthroderma simii*)]	无改变	迅速	细颗粒状,粉末状,正面奶油,浅黄色,背面灰白色,红褐色	大分生孢子丰富,常肿胀似厚壁孢子;小分生孢子泪滴形	碱性	阳性	阳性	好发于印度和非洲;似亲动物的须癣毛癣菌,但是大分生孢子的数量和形状不典型;可参考交配型或分子生物学对两者加以区分

（续　表）

皮肤真菌的种类和数量（如果已知其有性型，所列名称即为有性名称）	提出的新名称[12]	生长速度	菌落特征	镜下形态	BCPMSG 培养基 pH 改变（7～10 天）	尿素酶试验（7 天）	毛发穿孔试验	其他特征
苏丹毛癣菌[b]（*T. soudanense*）	无改变	较慢	扁平，亮黄色，酒红色（不常见）；菌落伴有放射状条纹和星状边缘；少见絮状；背面黄色，酒红色	无大分生孢子，小分生孢子泪滴形，很少或无；放射状条纹上有菌丝反向分枝	碱性（范围小）	多数阴性，少数阳性	阴性	撒哈拉以南的非洲常见，欧洲和美洲散发；在 Lowenstein-Jensen 培养基上呈暗色菌落（与铁锈色小孢子菌比较）；是否需要生长因子不定；Graser 和同事[104-105]将其鉴定为红色毛癣菌的一个亚型
土生毛癣菌复合体[b]（*Trichophyton terrestre* complex）［豆状节皮菌（*Arthroderma lenticulare*）、四裂节皮菌（*A. quadrifidum*）、伊星古拉节皮菌（*Arthroderma insingulare*）］；同类的黑斑毛癣菌（*Trichophyton eboreum*）［节皮菌属（*Arthroderma*）］、突尼斯毛癣菌（*Trichophyton thuringiense*）	无改变，但现在提出在节皮菌属里，将黑斑毛癣菌（*T. eboreum*）称为黑斑节皮菌（*Arthroderma eboreum*）	较快速	表面粉末状，白色，奶油色或粉色；背面颜色可为灰白色，红色，偶尔黄色	大分生孢子丰富，体积较小，少于 5 个分隔，可见与连续的大棒状小分生孢子逐渐融合（图 126-9），从而形成含有 1、2 或 3 个细胞的分生孢子	碱性	阳性	阳性	体外培养 37 ℃不生长，不致病
断发毛癣菌[a]（*T. tonsurans*）	无改变	较慢	粉末状，绒毛状，表面白色，微黄色或红棕色；背面板栗色，红棕色（图 126-18f）和（或）硫磺色，极少灰白色	大分生孢子罕见，体积较小，铅笔状或棒状；小分生孢子丰富（图 126-10），常位于较粗的"火柴棍"样结构上；可见"气球状"和"丝状分枝"菌丝	碱性，有时较弱	阳性	多数阴性 少数阳性	维生素 B_1 促进生长；目前描述了该真菌仅产生大分生孢子的一种形式
万氏毛癣菌[c]（*Trichophyton vanbreuseghemii*）［格勒特节皮菌（*A. gertleri*）］	格勒特节皮菌（*Arthroderma gertleri*）	较慢	菌落浅黄色，皮革样，细颗粒状；背面灰白色或灰黄色	大分生孢子丰富，分隔长短不一，易断裂成单细胞；小分生孢子细小，方型	无数据	阳性	阳性	临床实验室很罕见，亲土壤性

（续 表）

皮肤真菌的种类和数量（如果已知其有性型，所列名称即为有性名称）	提出的新名称[12]	生长速度	菌落特征	镜下形态	BCPMSG培养基pH改变（7～10天）	尿素酶试验（7天）	毛发穿孔试验	其他特征
疣状毛癣菌[a]（*Trichophyton verrucosum*）	无改变	慢	脑回状，微绒毛状白色、浅褐色或赭色的菌落	大分生孢子极少见，似鼠尾样延伸；小分生孢子圆形，泪滴形；37 ℃生长在含牛奶固体的培养物，可见对称的厚壁孢子链（图126-11）	碱性（有时很弱）有宽而清晰的区域	阴性	阴性	人通常由牛感染；37 ℃刺激生长
紫色毛癣菌[b]（*Trichophyton violaceum*）	无改变	慢	无毛（秃顶）、平滑或脑回状的菌落；紫红色，有时边缘呈白色；从东非分离的菌株为纯白色	大分生孢子极少见；在硫胺素培养基或孢子形成培养基上可见水滴状小分生孢子；牛奶固体培养基37 ℃培养可见不对称的厚壁孢子链	pH值无改变或微弱呈碱性，有窄至宽的清晰的区域（14天后变宽）	阳性或弱阳性	阴性	北非和中东地方病，但广泛传播于欧洲、美洲、南非的全球性地区

注：[a]常见；[b]不常见，但可在欧美国家大型实验室见到；[c]罕见，仅在地方水平测试或土壤分离试验中可见

表126-2 以宿主偏好和自然栖息地为基础的皮肤癣菌类群[a]

亲人性	亲动物性	亲土性
絮状表皮癣菌(*Epidermophyton floccosum*)	犬小孢子菌(*Microsporum canis*)	石膏小孢子菌复合体(*Microsporum gypseum* complex)[石膏奈尼兹皮真菌属(*Nannizzia gypsea*)]
奥杜盎小孢子菌(*Microsporum audouinii*)	鸡禽小孢子菌(*M. gallinae*)[鸡小孢子菌(*Lophophyton gallinae*)]	早熟小孢子菌(*M. praecox*)[早熟奈尼兹皮真菌属(*Nannizzia praecox*)]
铁锈色小孢子菌(*M. ferrugineum*)	微小小孢子菌(*M. nanum*)[微小奈尼兹皮真菌属(*Nannizzia nana*)]	
同心毛癣菌(*Trichophyton concentricum*)	桃色小孢子菌(*M. persicolor*)[桃色奈尼兹皮真菌属(*Nannizzia persicolor*)]	万博小孢子菌(*M. vanbreuseghemii*)[鸡小孢子菌(*L. gallinae*)]
麦格尼毛癣菌(*T. megninii*)	马毛癣菌(*Trichophyton equinum*)	万博毛癣菌(*Trichophyton vanbreuseghemii*)[格勒特节皮菌(*Arthroderma gertleri*)]
须癣毛癣菌复合体(绒毛状、棉絮状的菌落)(*T. mentagrophytes* complex)	意瑞奈斯毛癣菌(*T. erinacei*)	
红色毛癣菌(*T. rubrum*)	须癣毛癣菌复合体(颗粒状菌落)(*T. mentagrophytes* complex)	
许兰毛癣菌(*T. schoenleinii*)	猴毛癣菌(*T. simii*)	
苏丹毛癣菌(*T. soudanense*)	疣状毛癣菌(*T. verrucosum*)	
断发毛癣菌(*T. tonsurans*)		
紫色毛癣菌(*T. violaceum*)		

注:[a] 一般非致病性的亲土的皮肤癣菌未被列入表中,例如:土生毛癣菌(*T. terrestre*)和库克小孢子菌(*M. cookei*)[库克帕杆菌(*Paraphyton cookei*)]

癣菌一般不能侵入更深层组织。急性病例中出现了部分由 $CD4^+$ 淋巴细胞介导的强烈的Ⅰ型辅助T细胞(Th1)反应[28],而在慢性病例中出现了速发型超敏反应,特征为IgE和 IgG_4 呈高水平并且单核细胞产生Th2细胞因子[29]。

皮肤癣菌倾向于在被感染皮肤区域内呈环状生长,形成一个癣病感染的形态,伴有或多或少的突起,边缘为红斑活跃区,在皮损的中心是鳞片状的相对不活跃区。微生物经常能够从活跃的边缘环状区分离出来。感染程度可从轻微至严重,部分是由宿主对真菌代谢物的反应程度不同而导致的结果。感染菌株的毒力、感染的解剖学部位、宿主免疫系统的状况和局部环境因素在决定感染的严重程度方面也是非常重要的。某些少见的情况下,尤其是在免疫系统受损的患者中,皮肤癣菌也能入侵皮下组织,如马约基肉芽肿(Mayoki's granuloma)、脓癣、足菌肿样病程[30-31],或者更为罕见的全身系统性感染[32]。据报道,在免疫系统受损的患者中出现了可能导致皮肤芽生菌病的红色毛癣菌感染[33],还有1例慢性肉芽肿病患者,其足部真菌培养为阴性的慢性溃疡性皮损,经PCR和DNA测序诊断为红色毛癣菌感染所致的足癣[34]。

简而言之,皮肤癣菌病常见的主要危险因素包括年龄(青年的头癣和老年的甲癣);慢性皮肤癣菌病的家族史;参与身体广泛接触类型的体育项目(如摔跤和柔道)或足部浸渍(如马拉松跑);赤足使用公共水设施(淋浴和游泳区域);交换头部佩戴的装备、鞋类或未充分清洁的寝具;接触野生的驯养动物(尤其是流浪猫)或集体喂养机构新近提供的动物(尤其是猫、豚鼠、兔子、实验大鼠和牲畜);居住在啮齿类侵扰的住所;尤其是对于发展中国家的儿童接触了带有未经治疗的皮肤癣菌病的牲畜;接触未被有效消毒的理发工具[20,27,35-42]。

四、解剖学特性

皮肤癣菌导致的感染是根据解剖学部位来命名的,例如,须癣(胡须)、头癣(头皮、眉毛和睫毛)、体癣(面部、躯干和四肢)、股癣(腹股沟、会阴和肛周)、足癣(足底和趾间)、手癣(手掌)和甲癣(指甲)。不同的皮肤癣菌可能造成临床上相同的

损伤，而一种真菌可感染很多不同的解剖学部位。

须癣通常由亲动物真菌引起，如疣状毛癣菌（*Trichophyton verrucosum*）和颗粒状须癣毛癣菌（*Trichophyton mentagrophytes*）复合体的亲动物种，典型特征是高度发炎并且可能表现为急性脓疱性毛囊炎，进一步发展为化脓性沼泽样皮损（脓癣）。轻微一点的表现为干性红斑或鳞状损伤。头癣症状可能会有差异，从含有灰色头发残端的暗红斑伴凹凸、鳞屑，到毛囊炎、脓癣形成、脱发和结痂的高度炎性损伤。在特定的地理位置断发毛癣菌和犬小孢子菌是最常见的致病菌[16-17]。黄癣通常由许兰毛癣菌（*Trichophyton schoenleinii*）引起，但也可能由紫色毛癣菌（*Trichophyton violaceum*）或石膏小孢子菌（*Microsporum gypseum*）[建议名为石膏样奈尼兹皮真菌属（*Nannizzia gypsea*）[12]]引起，目前是头皮和无毛（光秃的）皮肤的一种非常罕见的慢性感染，特征是形成与蜂巢相似的杯状痂（黄癣痂）。体癣可能由任何皮肤癣菌引起，但是通常和亲动物皮肤癣菌相关，通常形成环状红斑损伤，表现为鳞状、凸起、有活性的，常有囊泡状的边缘。躯干和四肢上的慢性损伤通常由红色毛癣菌引起，尤其是该真菌的亚非型[称为鲁比切克毛癣菌（*Trichophyton raubitschekii*）]。股癣（"jock itch"）常由红色毛癣菌或絮状表皮癣菌（*Epidermophyton floccosum*）引起，通常出现鳞状红斑甚至黄褐色斑，平行和不对称的向下延伸至大腿内侧，边缘锐利，通常布满颗粒状和小水疱。足癣的症状表现各有不同：最常见的症状是软化、脱皮、瘙痒和第 4、5 脚趾间开裂的疼痛，可能出现带有水疱、脓疱的急性感染或足底过角质化的慢性感染[又称香港脚（moccasin foot）]。须癣毛癣菌复合体的成员经常引起更多的炎症性感染，而红色毛癣菌通常导致更多的慢性感染。趾间毛癣菌（*Trichophyton interoligitale*）为须癣毛癣菌复合体成员之一，其引起的足底感染表现为在足底弓，足两侧的薄皮肤处，邻近足底角质层的足跟处形成大水疱[43]。甲癣即指甲的皮肤癣菌感染，是更为常见的甲真菌病（真菌性指甲感染）的一个子范畴，大多数情况下是由红色毛癣菌引起。通常表现为指甲增厚、变形、变脆、褪色，并在指甲下有碎屑堆积。这类症状是由病菌侵入末端指甲下面所导致，因此被定义为末端甲下真菌病。通常由趾间毛癣菌引起的一种不太常见的感染类型，一般表现为"表面白色的甲真菌病"，尤其是在早期阶段，例如，在指甲表面出现白色斑。"近端甲下甲癣"也是有可能发生的。这种感染是指甲从新月区域的起始点附近开始向甲下感染，通常由红色毛癣菌导致并且常常是免疫抑制的一种征象，比如艾滋病（AIDS）[44]。

五、标本的采集、运输和储存

（一）初步的患者检查

在犬小孢子菌感染导致的头癣病变部位，可以在暗室中通过伍德灯（Wood's lamp）（经过波长为 365 nm 滤光片的紫外线）进行检查，看是否出现亮绿色带荧光的头发。这些手段对于实验室标本的采集是非常理想的，尽管在有些情况下通过伍德灯的诊断就已经足够了。带有荧光的头发为伍德灯阳性，通常在直接镜检中显示为小分生孢子发外癣菌的头发感染。除了犬小孢子菌，奥杜盎小孢子菌和铁锈色小孢子菌也引起这种带有荧光的发外癣菌感染。被许兰毛癣菌感染的头发可能表现为暗绿色[42]。伍德灯也可用来区分皮肤癣菌病和临床表现相似的非真菌皮肤病，如红癣，红癣病患者的皮肤会发出橘红色至珊瑚红色的荧光，而皮肤癣菌病的皮肤是不发出荧光的。

（二）采样准备和操作

应该采集足够的临床样本以满足直接镜检和培养的需要。然而，如果临床样本的量有限，应该优先用于直接镜检而不是真菌培养。直接镜检是非常灵敏的技术[17]，显微镜观察到皮肤样本中含有真菌的成分是真菌感染的诊断特征，是可以使用抗真菌治疗的充分证据。如果可行的话，在样本采集和运送的过程中应使用无菌技术来尽量避免污染。应该使用以下器材：拔头发用的镊子；无菌的 15 号手术刀片或锋利的刮匙；无菌指甲剪、剪刀；无菌纱布块；用于消毒的 70% 乙醇；用于清理疼痛部位的无菌水；干净药袋或干净信封用于收纳和运送临床样本，例如头发，皮肤刮屑或指甲剪取物。采集中可能会用到黑色相纸或结实的黑纸来使刮屑更容易观察。采样后，将纸折叠，其边角的部位用胶带封死，然后放入信封中以便运输。有数种可以买到的运输包装系统，其中 2 个是

Myco Trans样本运送系统和Dermapak。不推荐使用密封的管子来收纳样本，因为它们会存留水汽，而导致细菌或真菌污染物的过度生长。推荐使用一次性无菌刷从头皮或动物毛皮进行采样[45]。实际上，在美国经常使用一次性牙刷进行皮肤采样，采样后将硬毛部分按入培养基的几个不同位置。如果组织病理学处理已经完成，剪下的指甲可以放在4%福尔马林溶液中[46]。可以在采样时直接接种培养基(下文详述)。

应使用无菌镊子拔发。如果样本是伍德灯阳性，则选择带荧光的头发。无荧光的头发，尤其是那些被诸如断发毛癣菌的发内癣菌侵染的头发，可能需要用无菌手术刀的尖端将其剔出来，原因是这种头发经常在头皮处断裂而很难用镊子拔出。用湿润的无菌棉擦拭儿童患者头皮已被证明是成功的方法[47]。在罕见的黄癣情况下，毛囊口处的黄癣痂适合用于培养和镜检。在下肢的皮肤癣菌病中，带有清晰边界的病变应该预先用乙醇消毒或用无菌水清理，然后用手术刀(或牙刷，见上文)在活跃的边界区域刮取表皮碎屑。如果边界不明显而无法判断真菌的最活跃区，如手癣，可以在预先清洗过的感染区域的不同部位广泛地刮取样本，这样获取的样本与目前的真菌活性差别应该是很小的。在足部水疱癣中，可以用无菌的剪刀剪取水疱的顶端用于直接镜检和培养。不建议对水疱液进行培养。

应使用乙醇纱布对指甲进行消毒。对于典型的甲下甲真菌病，最理想的培养材料是甲下含有真菌成分的蜡状碎屑。阳性率最高的有效培养成分是甲床的边缘部分。在进行采样培养前，要用手术刀除去指甲下面近顶端的脆弱部分的易碎屑以避免腐生真菌和细菌的污染。一些研究人员会先把指甲剪短，然后，在修剪的地方刮掉污染的物质。如果甲背部染病(表层白色甲真菌病)，要刮取并丢弃表层后再取下层材料进行培养。在临床表现与苏丹毛癣菌(*Trichophyton soudanense*)引起的甲内型指甲感染相同的罕见病例中[48]，指甲板内层呈乳白色，但上面和下面指甲表面却相对未受影响，可以修剪指甲或暴露出乳白色区域来刮取样本。

任何需要运输或因其他原因不能立即处理的样本应该保留在上述的纸袋内。不建议使用密封管来收纳标本，因为它们容易留存水汽而导致污染物的过度生长。皮肤、头发和指甲的干燥样本中的皮肤癣菌可以在适宜条件下存放数年，前提是材料不受极端温度的影响。

六、样本的实验室检验

(一)直接镜检

对皮肤、头发和指甲的直接镜检是确定病原真菌的最快速的方法，通常将临床样本置于10%氢氧化钾(KOH)溶液中进行检验(可以替换为更为便宜的氢氧化钠溶液(NaOH))[49-50]。另一个常用的方法是使用25%KOH或NaOH与5%的甘油混合，防止干燥[49]。添加诸如钙荧光增白剂(Sigma-Aldrich,St. Louis,MO)或勃仑可风荧光增白剂(Blankophor GmbH,Leverkusen,Germany)的荧光增白剂能显著提高准确性，尤其是在检验人员对镜下直接镜检真菌成分经验不够丰富的情况下大有帮助[51-52]。在指甲检验中，与使用氢氧化物进行的直接镜检相比，用过碘酸雪夫染色对指甲活检样本进行染色的组织病理方法已经被证明可以得出更为准确的结果[53]。然而，关于活组织切片检查/过碘酸雪夫染色能够替代培养[53]的建议是错误的，这种技术不能可靠地区分皮肤癣菌和其他感染指甲的菌种[54]。

无菌操作下将指甲剪成小块，在可能的情况下，可用重物将其在收集袋内捣碎，或用无菌手术刀刮擦，以获取含有最多的皮肤癣菌接种物的易碎、片状的样本。将皮肤或指甲的刮取物，指甲碎片或发根置于一个洁净的载玻片上，加1～2滴上述KOH或NaOH溶液，盖上盖玻片，然后，在本生灯火焰上快速通过3～4次缓慢加热(不可煮沸)进行固定，然后置于室温几分钟等样本变清亮。具体时间取决于所使用氢氧化物的浓度、样本碎片的厚度和接触火焰所获得的热量。另一种方法可以将载玻片放在温度设置为51～54 ℃载玻片加温器内加热1 h[49]。或者在添加荧光增强剂之前，将样本置于含碱液的封闭无菌管中室温孵育1～2 h。肉眼观察样本变得清亮表明刮取物的不透明性降低。如果实验室用的是10%KOH或NaOH溶液，可能会发现指甲屑需要一种更强的碱溶剂(最高可达25%KOH或NaOH)。为便于观察真菌，标本处理中还可用钙荧光白[50]或其他的葡聚糖结合荧光染料，如刚果红[49]。这些需

要使用荧光显微镜来观察所产生的特异性荧光。将荧光增白剂直接加到载玻片上的 KOH 液滴中，使终浓度达到约 0.1%[55]。所有的样本应先经低倍镜镜检，然后再用高倍镜确认。

与皮肤癣菌有关的皮肤和指甲的感染可以观察到下面一种或几种情况：透明的菌丝段、有隔的、常常分枝的菌丝和分生孢子链（图 126-1）。被感染的毛发的外观依赖于侵染的皮肤癣菌的种类。菌丝侵染毛发时，会断裂形成分生孢子，分生孢子的外观、位置及大小[42]可以提示感染真菌的属或种（表 126-3）。通过直接显微镜检查可以观察到种主要的种群类型（发外癣菌、发内癣菌和黄癣菌）。发外癣菌和发内癣菌是指分生孢子在毛干上的相对位置（"ecto-"和"endo-"分别表示 "外"和"内"），而黄癣菌专指许兰毛癣菌引起的感染，除了中亚和非洲萨赫勒部分地区，这种真菌在其他地区已经是极为罕见了。

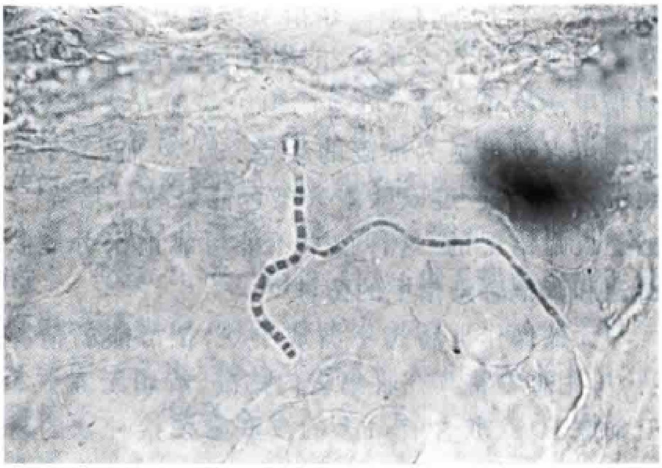


图 126-1 皮肤刮取物中的皮肤癣菌菌丝，NaOH 封片。放大倍数，×400

在发外癣菌的寄生部位，分生孢子在毛发周围呈马赛克状，或在毛干表面呈链状（图 126-2）。在犬小孢子菌、奥杜盎小孢子菌和铁锈色小孢子菌感染时，受感染的毛发在伍德灯下发出绿色荧光，而其他的发外癣菌感染（表 126-3）是不发出荧光的。发内癣菌感染可观察到短的发根内部充满了分生孢子链（图 126-3），毛发为伍德灯阴性。在黄癣菌感染毛发中，在毛发内部可以观察到菌丝、气泡，或通道和脂肪滴（图 126-4），这些毛发在伍德灯下呈暗绿色。一般来说，所有被感染的毛发，在感染的过程中，通常是在感染的早期阶段，发干内可显示出菌丝。

表 126-3 侵染人体头发的皮肤癣菌

发外癣菌	发内癣菌	黄癣菌
奥杜盎小孢子菌	苏丹毛癣菌	许兰毛癣菌
犬小孢子菌	断发毛癣菌	
铁锈色小孢子菌	紫色毛癣菌	
石膏小孢子菌复合体[石膏奈尼兹皮真菌(*Nannizzia gypsea*)]		
早熟小孢子菌[早熟奈尼兹皮真菌(*Nannizzia praecox*)]		
麦格尼毛癣菌		
须癣毛癣菌复合体		
疣状毛癣菌		

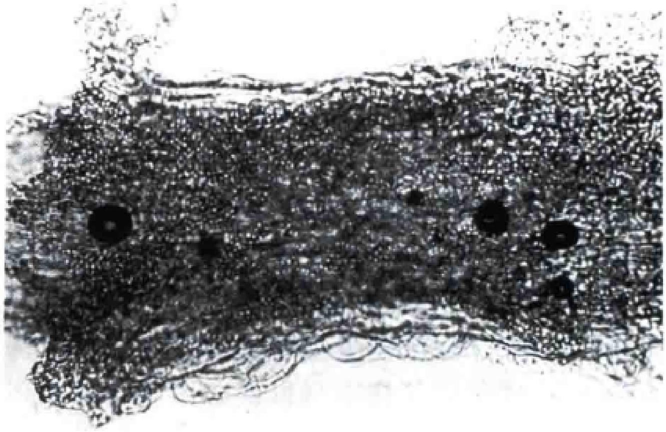


图 126-2 奥杜盎小孢子菌发外癣菌侵染的头发。放大倍数，×400



图 126-3 断发毛癣菌发内癣菌侵染的头发。放大倍数，×1000

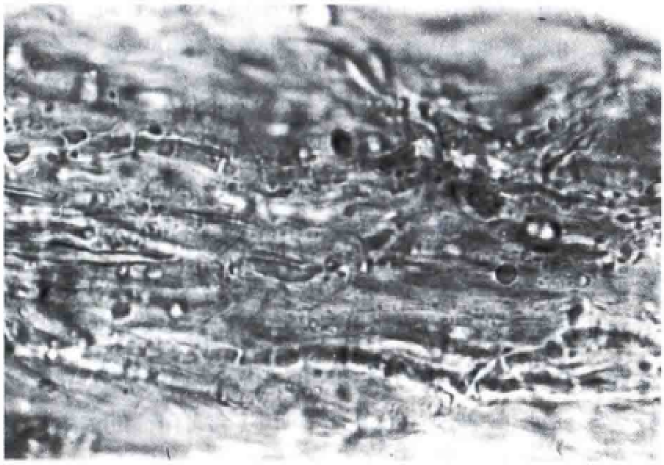


图126-4　许兰毛癣菌感染的黄癣患者的头发。放大倍数，×1000

(二)分离步骤

将上述步骤中采取的用于直接镜检的刮取物、头发和其他材料接种于选定的分离培养基上，在32 ℃最适条件下培养；如果适当延长培养时间以弥补低温下生长速度变缓，24～32 ℃的温度也是可以接受的。通常每个培养皿或试管中放入5～15个皮肤或指甲碎片用于分离，将这些碎片分开是为了避免具有抗生素耐受的霉菌或细菌污染物从一个碎片长到其他碎片上。头发也是容易分离的，在25～32 ℃下置于基础分离培养基上培养，并且每周例行检查，持续4周。

用于分离皮肤癣菌最常用的培养基是沙氏葡萄糖琼脂(Sabouraud glucose agar，SGA)[原始配方使用4%葡萄糖，埃蒙斯(Emmon)改良配方用2%葡萄糖]，添加了氯霉素和放线菌酮来抑制细菌和腐生真菌污染。这种培养基已经商品化，如Mycobiotic琼脂、Mycosel琼脂，或皮肤真菌选择添加剂。另外一个可以促进分生孢子快速产生和菌落色素沉积的培养基是添加放线菌酮和氯霉素的马铃薯薄片琼脂。对于分离引起类皮肤癣菌病的临床感染放线菌酮敏感型真菌，推荐使用含有氯霉素的SGA、霉菌抑制琼脂或利特曼牛胆汁(Littman oxgall)琼脂[50]。霉菌抑制琼脂和利特曼牛胆汁琼脂具有限制污染菌菌落扩散生长的优势。对于被细菌严重污染的样本，建议在所有培养基中添加庆大霉素[56]。在一些实验室中，含有放线菌酮、氯霉素和庆大霉素的SGA通常用作分离培养基[49]。

特殊情况下可以使用其他培养基和选择性的培养基。例如，添加放线菌酮、氯霉素和庆大霉素的不含维生素的酪氨酸(BD)-赤藻糖醇-白蛋白琼脂培养基，可以用于皮肤和甲丝状真菌的培养，特别是那些不利于念珠菌过度生长的身体部位(例如腹股沟和指甲)。这种培养基(据笔者所知，目前还没有商品化成品)可以防止大量的白色念珠菌、近平假丝酵母菌和相关的需要生物素的酵母菌对皮肤癣菌生长的共同抑制[57]。需要维生素的皮肤癣菌种类(在这些类型的病例中非常罕见)可能在这种培养基上生长不良，这种培养基也经常和一种含有放线菌酮的SGA培养基结合使用。

另外一种可取的初级分离培养基是皮肤癣菌检测培养基(DTM，可以从BD、Hardy和Remel等公司买到，其他公司详见第118章)。这种选择培养基用于从高度污染样本(指甲等)中筛选皮肤癣菌。皮肤癣菌的生长会导致pH的升高，使酚红指示剂的颜色由黄变红[58]。DTM的使用应与形态学研究相结合，因为非皮肤癣菌(通常是非致病性的土性物种，因此不属于皮肤癣菌)，例如，土生毛癣菌(*Trichophyton terrestre*)、各种金孢子菌属(*Chrysosporium*)和其他非皮肤癣菌可以生长并使培养基变红[49,59-60]。上面提到的快速孢子形成培养基马铃薯淀粉琼脂含有一种原理类似的指示剂，但颜色是从黄色变为蓝绿色，是与典型的红色毛癣菌红色相反的色素的颜色[61]。小孢子菌属个别种可以出现DTM的假阴性反应结果[62]。

(三)基于核酸的直接检测技术

已经公布了很多用于直接检测组织中皮肤癣菌DNA的技术，但是还没有任何一个技术被确立为常规诊断方法。这主要是由于传统程序的成本相对较低。然而，对于准确性而言，传统方法绝不是最理想的，例如，在甲真菌病(onychomycosis)中，传统方法检验原始患者样本最高可以确诊85%的真阳性病例，并且在很多实验室中远远低于这个比率[54]。这强烈促使人们开发分子诊断技术。目前，已经发表了大量有关皮肤癣菌病和相关的霉菌病(例如，非皮肤癣菌丝状真菌病)的皮肤标本快速PCR的初步研究结果。采用的技术包括PCR-酶联免疫吸附试验[63]、PCR-反向线性

杂交[64]、PCR 耦联限制性片段长度多态性分析[65]、多重 PCR[66]、巢式 PCR[67]、能够对红色毛癣菌进行菌株序列分析的基于微卫星位点的 PCR[68]，以及直接测序 PCR[48]。此外，在试验研究中，实时定量 PCR[69-71] 等相关技术已经被证明效果良好，但是对于日常诊断，在实验室研究中是否一贯实用和性价比需要进一步证明。Jensen 和 Arendrup 的综述已经对这些技术进行了深入的讨论[72]。在一些特殊情况下，分子直接检测方法的利用极具价值，例如，在一个所有传统检验都给出了阴性结果的深层皮肤癣菌病例中，通过巢式 PCR 研究从石蜡包埋切片中扩增了一部分 ITS 区域而鉴定出了红色毛癣菌[73]；在慢性肉芽肿患者的足癣病例中，实时定量 PCR 和测序技术从培养阴性的活检样本中明确鉴定出了红色毛癣菌[34]。

七、鉴定

目前，绝大部分皮肤癣菌是通过表型来鉴定的。鉴定通常基于：①在 SGA 培养基上的纯培养物的菌落特征；②显微形态学特征。由于不同菌落外观可能不同也可能相同，所以这些单独的评判标准可能是不够的。特征性的色素沉积可能显现不出，而且有个别的种，尤其是须癣毛癣菌，可能不产生孢子。可使用特殊培养基来促进色素产生和孢子形成；生理测试与形态学特征在正确鉴定菌种时是必需的。大部分的分离菌是容易通过肉眼检查结合一些特征性的生长因子需求测试来鉴定的，这使表型研究成为日常检验中成本最低的方法。然而，尽管除了在高水平的参考实验室之外很少实际应用，但分子鉴定方法包括 PCR 扩增和 ITS 区域的测序（目前霉菌鉴定的金标准[75]）可以鉴定那些出现错误表型的特殊分离菌。此外，几个近期的研究证明可以通过基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱（MALDI-TOF）来对常见的皮肤癣菌进行快速准确的鉴定。事实上，MALDI-TOF 鉴定与其测序结果的相关性比与基于传统表型方法的鉴定更密切[13,74]。

(一) 菌落特征

在菌落形态学观察时，注意菌落表面和反面的颜色，表面的结构（粉状、颗粒状、毛绒状、棉絮状、柔软的或光滑的），局部的形态（隆起、有褶、边缘等）和生长速度。

(二) 显微形态学

显微形态学，特别是分生孢子的表型和排列（大分生孢子和小分生孢子）及其他的一些结构，可以使用通过以下方法进行测定：透明胶带固定或在制备的小培养物上用乳酚棉蓝（LCB）、乳酚苯胺蓝（酚是乳酚棉蓝和乳酚苯胺蓝中的一个成分，是一种有害化学物质，所以含有酚的溶液制备、储存和使用应在经认证的化学安全柜中进行）、乳品红[49] 或更永久的固定液固定[75]。有时可能需要特殊的培养基来刺激孢子形成，比如玉米粉或玉米粉-葡萄糖琼脂，马铃薯-葡萄糖琼脂，SGA 添加 3%～5% 氯化钠[76-77]，食用谷类琼脂[49]，快速孢子形成培养基[61]，或乳状琼脂[78-79]（第 118 章）。

(三) 生理学试验

1. 体外毛发穿孔试验 体外毛发穿孔试验可以区分须癣毛癣菌复合群和红色毛癣菌的非典型分离株[80]。也可用于辅助区分其他，诸如区分犬小孢子菌和奥杜盎小孢子菌或区分早熟小孢子菌（*Microsporum praecox*）早熟奈尼兹皮真菌属（*Nannizzia preacox*）和石膏小孢子菌（石膏样奈尼兹皮真菌属）[81]。接触到须癣毛癣菌复合体成员，犬小孢子菌和石膏小孢子菌的毛发呈现出楔形的垂直于发干的楔形穿孔（阳性测试结果），而红色毛癣菌、奥杜盎小孢子菌和早熟小孢子菌[早熟奈尼兹皮真菌属]不形成这种穿孔结构。

将短的人发（最好为年龄小于 18 个月的儿童的头发）放入有盖培养皿，并 121 ℃高压蒸汽灭菌处理培养皿 10 min，加入 25 ml 无菌蒸馏水和 2～3 滴 10%无菌酵母提取物。用已在 SGA 上生长的待鉴定真菌的碎片接种于这些培养皿中，在 25 ℃进行培养，并且在 21 天的时期内定期检查这些培养皿。将头发剪取一小段，加入 1 滴乳酚棉蓝，然后在显微镜下检查头发穿孔情况。温和加热载玻片对检测到真菌有帮助。通常应以穿孔阳性的菌株作阳性对照试验，推荐使用犬小孢子菌。某些头发样本可能不适合本试验，原因不明，例如，可能预先接触了含有抗真菌

抑制因子的洗发液。

2. 特殊营养需求 营养测试用来帮助鉴定很少产生分生孢子或形态学上彼此相似的毛癣菌属的菌种[82]。某些菌种具有独特的营养需求，而其他的种则没有。不含维生素的酪氨酸基础培养基[毛癣菌属琼脂1(T1)]适用于这种方法，其中可添加不同的维生素，例如，肌醇(T2)、硫胺素和肌醇(T3)、硫胺素(T4)和烟酸(T5)。除此之外，还可使用硝酸铵基本培养基(T6)添加组氨酸(T7)。脱水形式的这些培养基可以从BD Biosciences公司购买，已经制备好的培养基可以从Remel公司购买。取小块待检测培养物(大头针顶端大小)放置在基本培养基(对照组)和添加有维生素和氨基酸的培养基的表面。必须注意避免将琼脂从真菌接种物转移到营养培养基中。将培养物置于室温(如果怀疑是疣状毛癣菌需37 ℃)培养7天和14天后进行观察。生长量评级为0～4$^+$。表126-4中归纳了常见的反应。

表126-4 皮肤癣菌在毛癣菌琼脂培养基(*Trichophyton* agars)中的营养响应[a]

种名	维生素试验					氨基酸试验	
	1	2	3	4	5	6	7
	不含维生素	肌醇	硫胺素+肌醇	硫胺素	烟酸	不含氨基酸	组氨酸
鸡禽小孢子菌(鸡小孢子菌)[b]						4	4
同心毛癣菌，50%	4	4	4	4	4		
同心毛癣菌，50%	2	2	4	4	2		
马毛癣菌的马毛变种	0	0	0	0	4		
马毛癣菌的自养变种	4	4	4	4	4		
麦格尼毛癣菌						0	4
苏丹毛癣菌	V	V	V	V	V	V	V
断发毛癣菌	1	1	4	4	1		
疣状毛癣菌，84%	1	2	4	2	1		
疣状毛癣菌，16%	1	1	4	4	1		
紫色毛癣菌	1	1	4	4	1		
紫色毛癣菌(罕见"雅德毛癣菌"形式)	4	4	4	4	4		

注：[a]表中仅包含菌体与营养因子需求之间的生长反应，并且选择比较的菌种一定是十分相近的。表中数字是根据传统的1$^+$～4$^+$来命名的，表示相对生长情况。0. 不生长；1. 微弱生长；典型的营养不良形态(非常稀疏，菌落仅深层生长，菌落直径与沙氏琼脂上的菌落相比很小)；2. 部分刺激生长，但与对照相比有明显的抑制；4. 与对照生长相当(表中无3$^+$)；V. 表示结果可变。[b]表中空白表示生长反应不能常规检测，但它与沙氏琼脂对照的生长反应无明显区别

3. 尿素水解 尿素水解特征提供的资料能够帮助区分红色毛癣菌(脲酶阴性)和须癣毛癣菌复合体成员(典型的脲酶阳性)，以及和尿素酶阳性的亚非或颗粒型红色毛癣菌区分，原称作鲁比切克毛癣菌[83-84]。Christensen尿素琼脂和肉汤培养基也有此功能，但肉汤培养基似乎更为灵敏[85]。通常尿素培养基接种后，在25～30 ℃培养7天。需要每2～3天检查试管，观察颜色是否由橙色或浅粉色变为紫红色，表明尿素酶阳性。对于新批次的此种培养基必须进行阴性和阳性对照试验，见表126-1。

4. 在BCPMSG培养基上生长 溴甲酚紫(BCP)-奶粉-葡萄糖(BCPMSG)培养基已有商业供应，称为皮肤癣菌牛奶琼脂(Hardy)。在这种培养基上生长的类型(丰富或稀少)及pH指示剂(BCP)向碱性的变化，是区分红色毛癣菌和须癣毛癣菌复合体，以及区分须癣毛癣菌和桃色小孢子菌(*Microsporum persicolor*)[桃色奈尼兹皮真菌属(*Nannizzia persicolor*)]的有价值指标[49,77,86]。在BCPMSG培养基上红色毛癣菌表现出局限生长并且没有碱性反应，而须癣毛癣菌复合体成员通常生长旺盛，有碱性反应。尽管桃色小孢子菌表现出生长旺盛但不出现碱性反应。其他用于区分须癣毛癣菌和来自桃色小孢子菌

[桃色奈尼兹皮真菌属]的近亲在其他部分进行阐述[87]。

将试验菌株接种于 BCPMSG 培养基斜面上，25 ℃培养 7 天后，检查 pH 的变化和生长特征。颜色由淡蓝色变为紫色表明碱性反应。

5. 在精米上的生长 不同于大部分皮肤癣菌，奥杜盎小孢子菌在精米上生长不良，并使米粒褪色为黄色[49,87]。这种方法对于将它们从犬小孢子菌和其他大米上生长的产孢皮肤癣菌中区分出来非常有用。尤其在奥杜盎小孢子菌流行的地区，例如，非洲撒哈拉沙漠以南地区，或者来自这些地区的移民或旅行者重新引入这种病毒的地区，这种方法可能特别有用。

该培养基的制备方法是 12 ml 三角瓶中将 1 份生大米和 3 份水[88]混合或将 8.0 g 稻粒和 125 ml 蒸馏水加入混合。15 lb/in^2 压力下高温灭菌 15 min。在米粒表面接种，25～30 ℃培养 2 周。

6. 耐温和增温 耐温和增温用于区分须癣毛癣菌复合体和土生毛癣菌复合体[伊星古拉节皮菌(*A. insingulare*)、豆状节皮菌(*A. lenticulare*)、四裂节皮菌(*A. quadrifidum*)][89]、须癣毛癣菌和桃色小孢子菌(桃色奈尼兹皮真菌属)[77]，苏丹毛癣菌和许兰毛癣菌[42]，以及苏丹毛癣菌和铁锈色小孢子菌[90]。在 37 ℃条件下，须癣毛癣菌复合体成员生长旺盛，而土生毛癣菌不生长，桃色小孢子菌通常生长稀少或不生长(已观察到一个非典型分离菌株生长旺盛)；疣状毛癣菌和苏丹毛癣菌的生长增强，但是许兰毛癣菌和铁锈色小孢子菌则不生长。

用同一培养物接种在 2 个 SGA 培养基斜面上。将一个斜面在室温下(25～30 ℃)培养，另一个在 37 ℃培养。当室温条件下的斜面上出现成熟菌落时，进行 2 个温度条件下培养物生长的比较。推荐使用适当的对照试验先进行比较。

(四)分子鉴定技术

随着 ITS-1 区域成为对霉菌包括皮肤癣菌进行分子鉴定的一个关键泛菌区[92-93]，人们正在推行使用 DNA 条码鉴定技术[91]。然而，尽管 PCR 扩增和 ITS-1 测序已经证明了其对皮肤癣菌鉴定的有效性[93]，还是有一些事项需要注意。第一，在将测序获得序列与公共同步序列进行比较时应特别小心，因为这些数据库中会散布着错误识别的真菌。第二，用于区分不同的毛癣菌属的保守核酸位点相对较少，这主要是由于核糖体重复序列的进化率相对较慢。许多其他基于核酸的皮肤癣菌鉴定技术在前几年已被公开发表，但并未达到广泛采纳。与之相竞争，近期出现了一些快速先进的菌种鉴定方法，包括采用$(GACA)_4$引物进行 PCR 扩增[94]，以及针对 ITS 2 基因区进行限制性片段长度多态性分析[95]。

八、病原体的描述

表 126-1 中列出了皮肤癣菌种类的典型特征。该表还包括了与之相似，但罕见或非致病的小孢子菌属和毛癣菌属中的一些菌种的数据。必须将小孢子菌属和毛癣菌属的非致病菌种与致病菌种加以区分。

皮肤癣菌的气生菌丝体可以产生 2 个类型的分生孢子：大的、多细胞、光滑或粗糙、薄壁或厚壁的大分生孢子和小的、单细胞、外壁光滑的小分生孢子。传统观点根据这 2 种分生孢子的有无和大分生孢子的表面形态(即粗糙还是光滑)将其分为 3 个属。实际上，当考虑到非典型分离株和种时，这些属在形态学上出现了相当大的重叠[96]。由于这个原因，直接在种的层面来鉴定分离菌远比在属的层面上鉴定更为方便。种的鉴定需要依据显微形态和分生孢子的排布(图 126-5～图 126-17)，菌落在 SGA 上的形态(图 126-18)和生理学试验(表 126-5)。

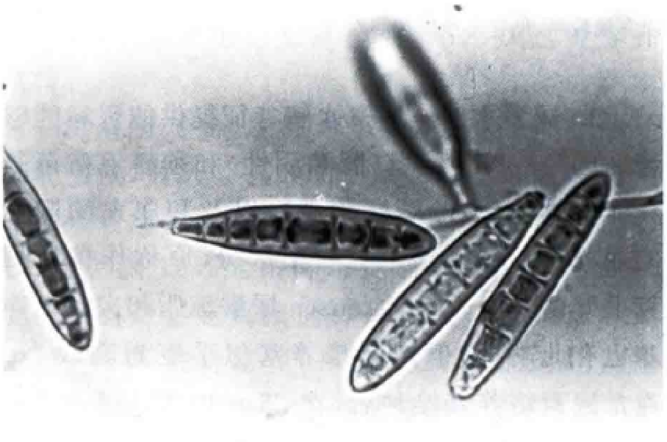


图 126-5 阿耶洛毛癣菌(*Trichophyton ajelloi*)[钩状节皮菌(*Arthroderma uncinatum*)]光滑壁的大型分生孢子。放大倍数，×400

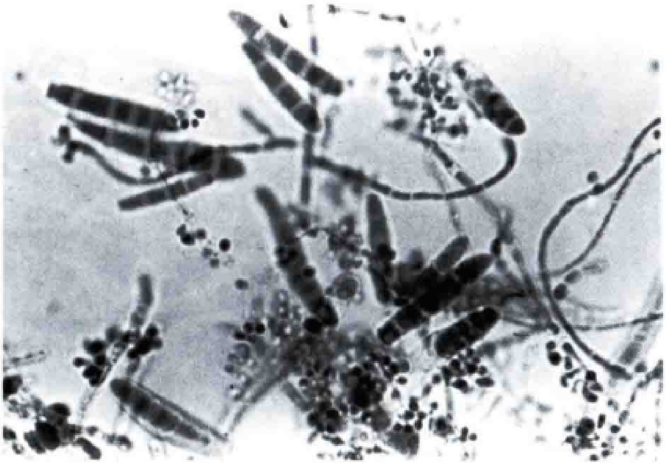


图 126-6　须癣毛癣复合体在含 5% NaCl 的 SGA 培养基上的大分生孢子和小分生孢子。放大倍数，×400

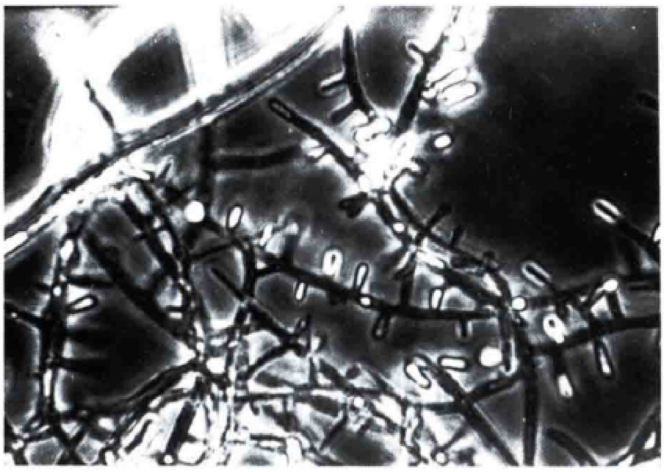


图 126-9　土生毛癣菌棒状的大分生孢子、小分生孢子和侧生的分生孢子。相差显微镜；放大倍数，×400

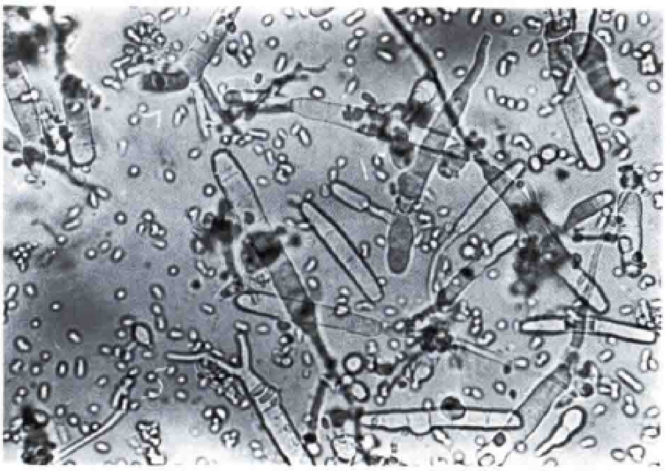


图 126-7　SGA 培养基上初次分离的非亚型红色毛癣菌(鲁比切克毛癣菌)的光滑壁的大分生孢子。放大倍数，×1000

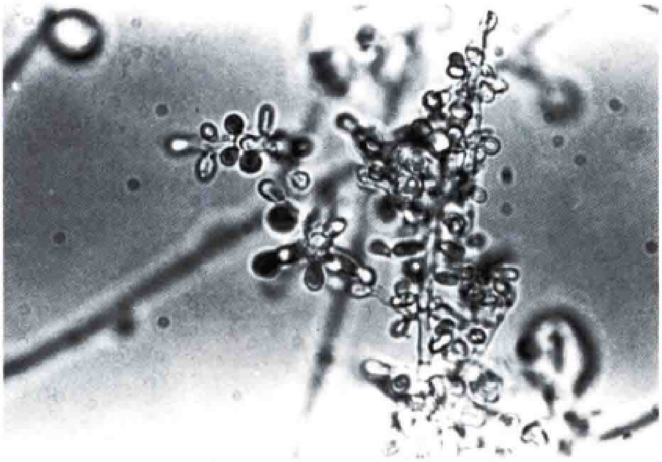


图 126-10　断发毛癣菌有典型的折射体胞质的小分生孢子。放大倍数，×400

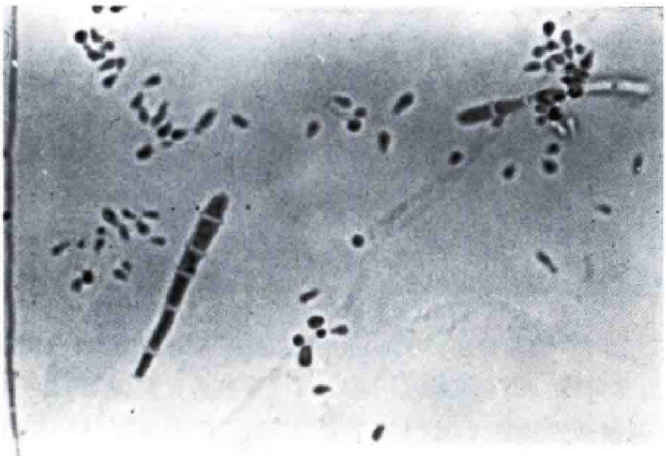


图 126-8　红色毛癣菌狭长大分生孢子和棒状到梨形的小分生孢子。放大倍数，×400

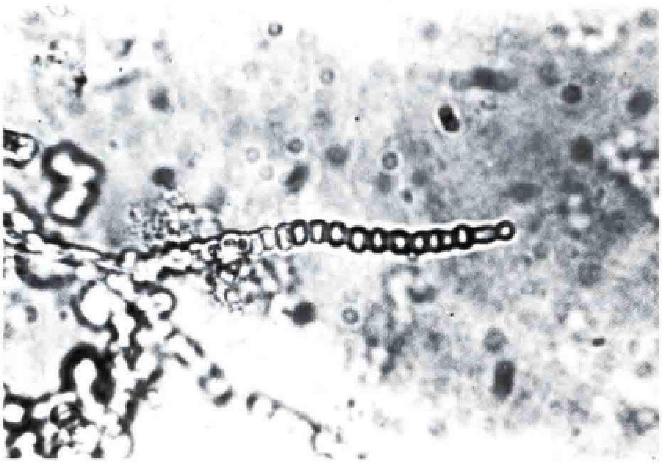


图 126-11　疣状毛癣菌在 BCP-奶粉-酵母提取物琼脂上产生的特征性的厚壁孢子。放大倍数，×400

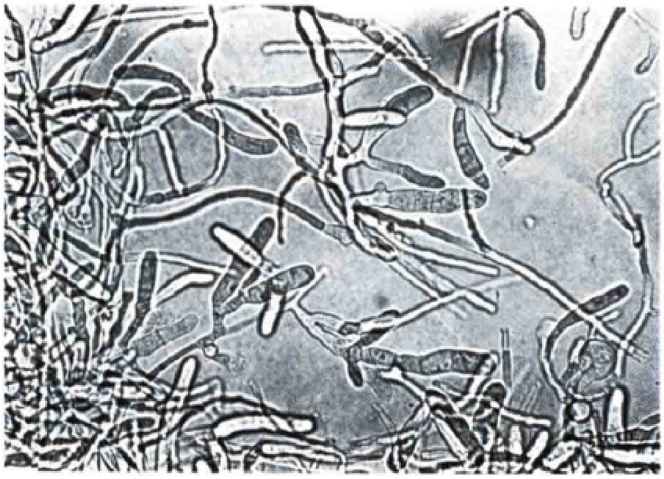


图 126-12 絮状表皮毛癣菌在 SGA 上产生的大分生孢子。注意没有小分生孢子。放大倍数，×400

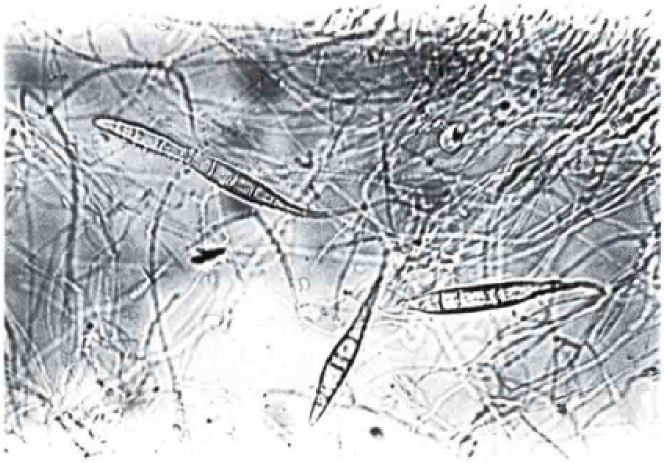


图 126-13 奥杜盎小孢子菌在含 3% NaCl 的 SGA 培养基上生长的大分生孢子。放大倍数，×400

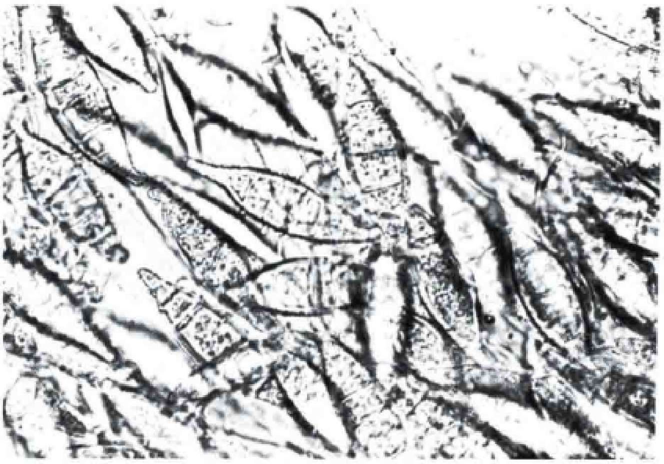


图 126-14 犬小孢子菌的大分生孢子，具有粗糙的厚壁。放大倍数，×400



图 126-15 库克小孢子菌的大分生孢子，厚壁和假隔膜。放大倍数，×400

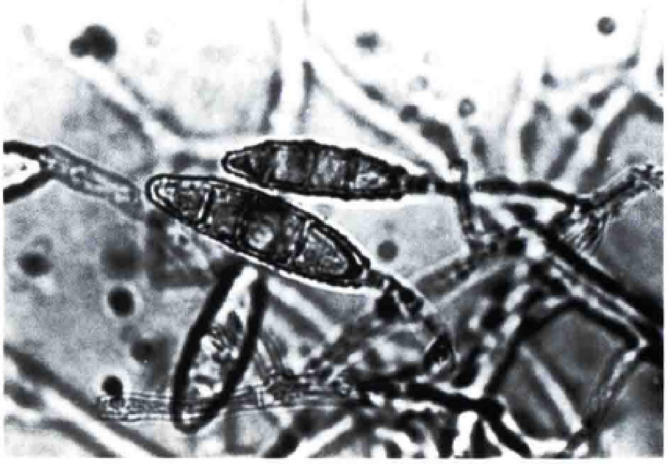


图 126-16 石膏小孢子菌[石膏奈尼兹皮真菌属(*N. persicolor*)]的大分生孢子。放大倍数，×400



图 126-17 桃色小孢子菌[奈尼兹皮真菌属(*Nannizzia*)]在含 3% NaCl 的 SGA 上形成粗糙壁的大分生孢子。放大倍数，×1000

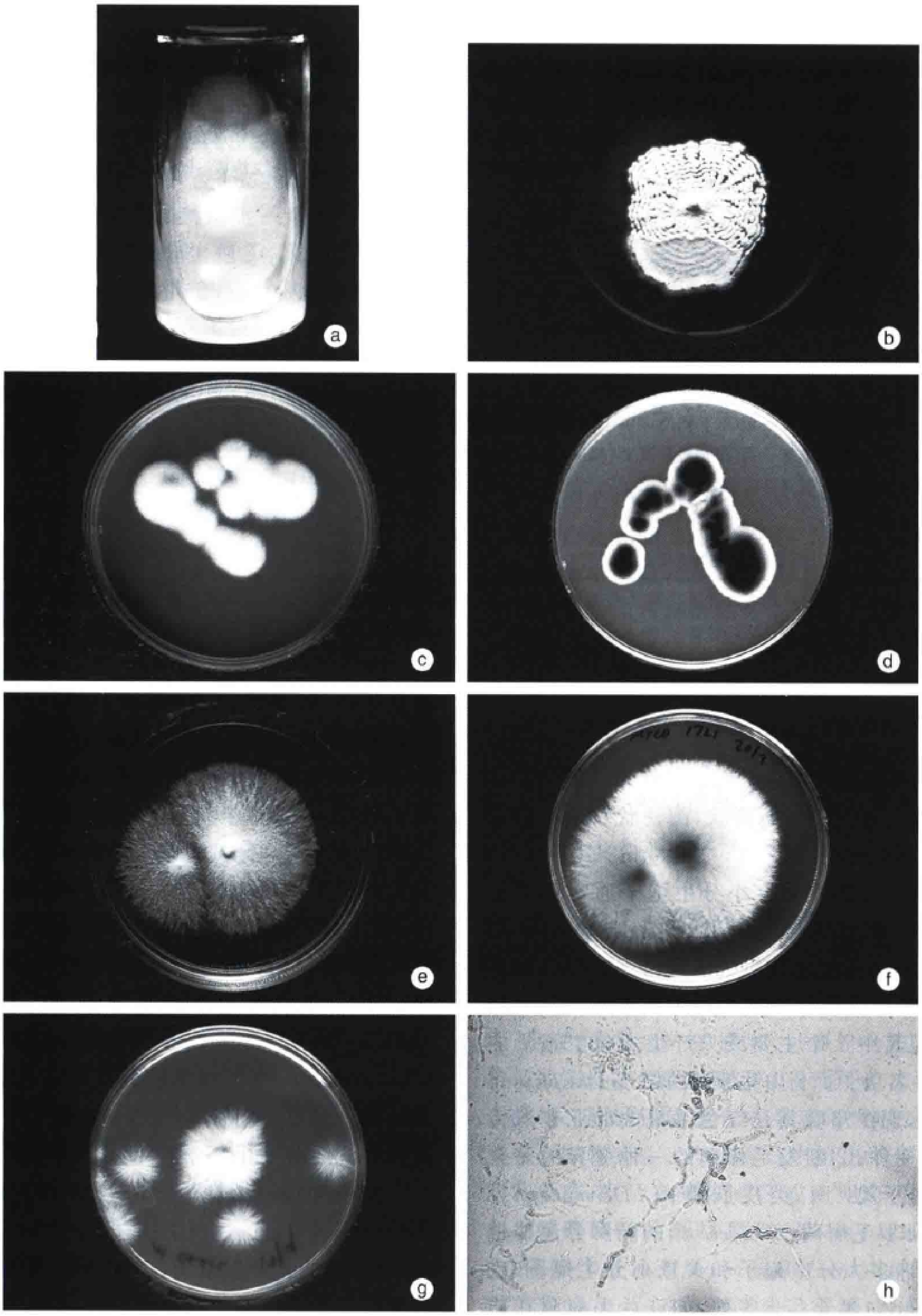


图 126-18　a. 须癣毛癣菌复合体：趾间毛癣菌的“结节性”变种（以前称 *Trichophyton krajdenii*），在 SGA 培养基上 12 天可见典型的亮黄色色素。b. 须癣毛癣菌复合体：颗粒状、亲动物的趾间毛癣菌（交配型菌株是万博节皮菌）培养 14 天的菌落。c. 红色毛癣菌 SGA 培养基上 10 天可见表面棉絮状白色的菌丝体。d. 红色毛癣菌 SGA 培养基上 10 天反面可见典型的红色素。e. 断发毛癣菌 SGA 培养基上 14 天表面可见低茸毛状的质地，混有白色和褐色的菌丝。f. 断发毛癣菌 SGA 培养基上 14 天反面可见红木色、红褐色和硫黄色的混合色。g. 犬小孢子菌 SGA 培养基上 10 天，菌落相对扁平，有淡色条纹，近菌落中心产黄色色素。h. 黑癣患者刮取物用 NaOH 封片可见威尼克外瓶霉的褐色菌丝。放大倍数，×400，见彩插

表 126-5 纯培养鉴定皮肤癣菌的流程[a]

1. 第 7 天和第 14 天(如有必要)检查菌落正面和背面的颜色、形态、质地、生长速度,之后进行步骤 2
2. 准备制片和镜检观察微观形态,特别是大分生孢子和小分生孢子的存在、外观及排列(查阅图 126-5 至图 126-18、表 126-1)。如果结论不确定,进行下一步
3. 如果阅片没提供足够信息,准备玻片培养或者用透明胶带封片并如上述检查形态学特征。如果在马铃薯葡萄糖琼脂、lactrimel 培养基、BCPMSG 培养基、含 3%～5% NaCl 的 SGA 培养基上都不能产生孢子,则需要特殊培养基。同时进行第 4 步
4. 必要时进行下列多种生理学和其他特殊试验,进行鉴定
   a. 脲酶试验(确保培养物无细菌)
   b. 若怀疑是毛癣菌属则需要做营养需求试验
   c. 若怀疑是小孢子菌属则需要做大米粒生长试验
   d. 高温试验(SGA 培养基 37 ℃培养,如果怀疑是疣状毛癣菌,则需要 BCPMSG 培养基培养)
   e. 特殊培养基鉴别:例如 BCPMSG 培养基可将须癣毛癣菌复合体与红色毛癣菌、桃色小孢子菌[奈尼兹皮真菌(*Nannizzia*)]区分;Lowenstein-Jensen 培养基或 BCPMSG 培养基可区分铁锈色小孢子菌与苏丹毛癣菌;含 3%～5% NaCl 的 SGA 培养基可将须癣毛癣菌复合体与桃色小孢子菌[奈尼兹皮真菌(*Nannizzia*)]、典型的红色毛癣菌区分;DTM 培养基可将不产孢子的表皮真菌与大多数其他不产孢子透明真菌区分
   f. 体外毛发穿孔试验。
   g. 分子生物学和交配型试验(需在参考实验室进行)

注:[a] 在进行第 4 步前,可能有必要进行脑-心浸液琼脂或 BCPMSG 培养基培养,以确保没有具抗生素抗性的细菌污染,之后再进行第 4 步。以上步骤参考 Weitzman 及其同事[19]和 Kane 等[49]的资料

(一)现有的种类

1. 毛癣菌属 大分生孢子具有光滑的薄或厚的壁,呈多形态(棒状,纺锤状,圆柱状),隔膜数量(1～12)和大小不同[(8～86) μm×(4～14) μm],单个或成簇出现。小分生孢子通常比大分生孢子的数量多,可以呈球状、梨形或棒状,在菌丝的侧面单个存在或葡萄状成簇出现。尽管该属的一些种通常更容易产生小分生孢子而不是大分生孢子,但其中 2 个主要或只产生大分生孢子的种系被命名为:①卡内毛癣菌属"*Trichophyton kanei*"[97],现在知晓其是红色毛癣菌的亚非遗传型的一个变种;②断发毛癣菌的一种变异的完全大分生孢子型[96]。类皮肤癣菌(*Dermatophytoid*)、阿耶罗毛癣菌(*T. ajelloi*)的新鲜分离株也可以产生许多大分生孢子和少量小分生孢子,或不产生小分生孢子。一些种,如许兰毛癣菌在培养中很少产生任何类型的分生孢子,初代培养中也能碰到通常具有分生孢子的种不产孢的分离株,如红色毛癣菌。

2. 小孢子菌属 根据种类和底物的不同,小孢子菌产生的大分生孢子和小分生孢子可能很少或很多。区分特征是通常外壁粗糙(程度为轻度粗糙至明显粗糙)的大分生孢子。大分生孢子的形状各异(倒卵形、纺锤形至圆柱纺锤形),隔膜数量各异(1～15),大小各异[(6～160) μm×6～25 μm],细胞壁宽度各异。小分生孢子呈梨形或棒状,通常单个排布在菌丝的侧面。小孢子菌属的菌种侵犯皮肤、毛发,极少侵入指甲。根据最近的分类学建议[12],小孢子菌中将只保留 3 种:犬小孢子菌(*M. canis*)、奥杜盎小孢子菌(*M. audounii*)和铁锈色小孢子菌(*M. ferrugineaum*)。石膏小孢子菌复合体中的物种(有性型形态),它们现在被囊括在奈尼兹皮真菌属(*Nannizzia*)[12],可以根据其在 Takashio 培养基上的菌落和显微特征进行初步鉴别[98],但最好是通过交配或分子生物学技术来鉴别这些物种。

3. 絮状表皮癣菌 在絮状表皮癣菌(*E. floccosum*)中,无小分生孢子,只产生孢子壁光滑、呈棒状的大分生孢子,在成熟菌落中经常出现大量的位于菌丝侧壁或顶端的厚壁孢子。大分生孢子具有 1～6 个隔膜,长 20～40 μm,宽 7～12 μm,以单个或 2～3 个成簇形成。絮状表皮癣菌是目前已知的唯一属于表皮癣菌属(*Epidermophyton*)的种属,之前的斯托克表皮癣菌(*Epidermophyton Stockdaleae*)现在被认为是阿耶罗毛癣菌[钩状节皮菌属(*Arthroderma uncinatum*)]的异名菌属[12,99]。

(二)新增菌属

1. 奈尼兹皮真菌属(*Nannizzia*) 奈尼兹皮真菌属最初由节皮菌属引入,是几种亲动物和亲土皮肤菌的有性形式,现已根据多位点种系分析(文献[12]及其中的参考文献)被重新确立为一个独特的属。奈尼兹皮真菌属产生一系列与小孢子菌属相似的小孢子和大分生孢子,大分生孢子从光滑薄壁到厚壁并明显粗糙,形状从棍棒状到宽雪茄形不等。目前认为,该属包括之前在小孢子菌属中的几个更稀有的亲动物和亲土生物,包括石膏样奈尼兹皮真菌属(*N. gypsea*)[石膏样小孢子菌属(*M. gypseum*)]、粉样奈尼兹皮真菌属(*N. fulva*)[粉样小孢子菌属(*M. fulvum*)]、桃色奈尼兹皮真菌属(*N. persicolor*)[桃色小孢子菌属(*M. persicolor*)]、内弯奈尼兹皮真菌属(*N. incurvata*)[内弯小孢子菌属(*M. incurvatum*)]和微小奈尼兹皮真菌属(*N. nana*)[微小小孢子菌属(*M. nanum*)]。

2. 帕氏杆菌属(*Paraphyton*) 这个新属[12]是最近提出的,包括以前被归入库克小孢子菌复合体[现在的库克小孢子菌、库克勒姆小孢子菌(*Paraphyton cookiellum*)、奇异小孢子菌(*Paraphyton mirabile*)]的亲土物种;大分生孢子通常大,多壁,粗糙,壁厚,而小孢子光滑,薄壁,呈棍棒状。

3. 鸡小孢子菌属(*Lophophyton gallinae*) 鸡小孢子菌属是鸡禽小孢子菌[12]的新组合,是家禽上的亲动物小孢子菌,还有一种形态不同的亲土形式;感染菌株的大分生孢子倾向于弯曲和近端锥形,而土壤来源的菌株的大孢子大,壁厚,且粗糙。

4. 节皮菌属(*Arthroderma*) 根据最近的提议[12],这个属包含亲动物和亲土物种,其中大多数并不致病或是极其罕见的人类感染的病原体。大分生孢子产生时多胞、厚壁粗糙;小孢子光滑,壁薄,棍棒状至近球形。

九、分型

亲人性的皮肤癣菌菌株之间的亲缘关系往往非常密切,这阻碍了流行病学分析技术的发展,但是红色毛癣菌中的菌株最终可以通过其核糖体非转录间隔区中亚重复元件数目的多态性进行区分[100-103]。还可以通过名为T1的微卫星标记方法,将红色毛癣菌的亚非系与当前在全球流行的其他菌株加以区分[104]。最近建立了一个简洁的包含多微卫星标记的分类系统[105]。也可以用非转录间隔区多态性区分趾间毛癣菌和断发毛癣菌的分离株[100,106-107]。对于当前所有针对皮肤癣菌的分子鉴定技术或它们在疾病暴发时的应用,限于篇幅本章无法展开论述,读者可参考Adbel-Rahman等[108]的多位点基因型鉴定系统,了解这些方法在真菌流行病学的发展中起到了哪些促进作用。

十、抗菌药物敏感性试验

原则上,可以使用针对霉菌的美国临床和实验室标准协会M38-A2标准程序,对皮肤癣菌进行抗真菌药物敏感性检测[109]。试验表明,这种方法在用于检测常用药物诸如环吡酮胺、氟康唑、灰黄霉素、伊曲康唑、泊沙康唑、特比萘芬和伏立康唑时,在实验室内和不同实验室间具有良好的可重复性[110]。然而,皮肤癣菌的耐药性很少见,治疗失败几乎总是缘于耐药性以外的其他因素[111]。因此,应严密筛查那些可能很烦琐的皮肤癣菌耐药性测试的需求,以确定其在科学和临床上的适当性。

十一、结果的评价、解释和报告

在非免疫功能低下的患者中,对于头发和除甲、足底、手掌之外的样本,只要符合皮肤癣菌病特征的阳性直接镜检结果,通常可以大致判定为皮癣病。阳性镜检报告本身就可反映这些信息,应在样本收到后2个工作日内给出结果。对于足底和手掌,生活在热带地区或南亚裔可能患有类似皮肤癣菌病的新柱顶孢(*Neoscytalidium*)[112][之前称作柱顶孢属(*Scytalidium*)、纳特拉斯酵母菌属(*Nattrassia*)和汉德逊霉属(*Hendersonula*),第127章]感染,这种感染在临床上和直接镜检中都与皮肤癣菌病相似[49],在没有培养结果的情况下不能进行推断性诊断。尽管如此,镜检结果仍需立即报告。对于没有新柱顶孢感染风险的患者,具有资质的医生可以对足底和手掌及其他皮肤部位的皮肤癣菌病进行推断性诊断。与甲真菌病有关的霉菌至少有35种,它们引起的临床症

状和显微镜形态都类似于甲癣[49]，尤其在老年患者。直接镜检可判定疑似的非皮肤癣菌，通常可见完整扭曲的菌丝(与节孢子相反)，并有明显的末端突起或菌丝肿胀。虽然培养结果也很重要，但直接镜检的结果仍需马上报告。同时，在培养时，引起甲真菌病的那些非皮癣菌的生长有时可能并不显著，但对于感染指甲的新胞菌，只要出现生长，就认为有临床意义。准确报告甲标本中非皮肤癣菌涉及一个复杂的流程，超出了本章的论述范围，但 Summerbell 等[54]对上述问题进行了严格的验证研究。

不管在最初的直接镜检中是否发现真菌成分，只要从皮损处的皮肤、头发或甲中培养出了皮肤癣菌，就具有诊断意义。值得注意的是，在其他证据出现前，分离出的类皮肤癣菌例如库克小孢子菌和土生毛癣菌都被认为是污染菌；报告其生长时标注"通常不致病"。这些真菌的名字充斥在大量错误和可疑的病例报道中，关于它们在致病中的地位还存在诸多谜题。从科学的角度确定这些真菌感染人类表皮的金标准，应该是在 3 个不同日期收集的病灶样本中连续分离到真菌，并且在感染组织中直接镜检到相应的真菌成分。从低质量证据中获得的推理诊断不能作为结论，即使患者被认为已经成功治愈。常见的皮肤癣菌，如红色毛癣菌有时并不能在原始培养基上生长，很有可能是这类病例的真正病原体[54]。特别是甲真菌病，能够从取自任一患者的原始标本中长出真正的致病皮肤癣菌的最高概率只有 75%，另外 15%从第二标本中获得，而约 10%只能通过 3 个或 3 个以上连续采样标本检测到，实践中很少做到[54]。如果从其他培养方式为阴性的单一标本中获得(任何数量的)耐环己酰亚胺类的皮肤癣菌，不应仅仅因为它们与皮肤癣菌属名相同就认定为致病真菌。

十二、浅部真菌病

在浅表真菌病中，致病真菌寄生在表皮的角质层或头发的囊上部位。很少引起宿主组织损伤和细胞反应。病损是大面积的表面损伤，包括皮肤色素形成的改变(花斑癣和黑癣)或者是沿着头发的发干末梢形成结节(黑发结节病和白发结节病)。

与皮肤癣菌病的病原体相比，此类疾病的病因是多种多样的且不相关的。

(一)花斑癣(花斑糠疹)

花斑癣是由糠秕马拉色菌(*Malassezia furfur*)复合体中一些很相近的亲脂酵母菌造成的角质层感染。复合体中感染人体皮肤的成员以前通常被视为是单一物种，但后来经过分子、生理学和血清学的研究，证明它们分别是不同的种[113-114]。该复合体包括糠秕马拉色菌[异名为：糠秕孢子菌(*Pityrosporum furfur*)、卵圆形糠秕孢子菌(*Pityrosporum ovale pro parte*)]、合轴马拉色菌(*M. sympodialis*)、球形马拉色菌(*M. globosa*)[即正圆形糠秕孢子菌(*Pityrosporum orbiculare*)]、限制马拉色菌(*M. restricta*)、斯洛菲马拉色菌(*M. slooffiae*)、钝圆马拉色菌(*M. obtusa*)、真皮马拉色菌(*M. dermatis*)、日本马拉色菌(*M. japonica*)和大和马拉色菌(*M. yamatoensis*)[6,115]。另外，陆续报道了一些感染动物的新种。在常规的临床报告中，上述的这些菌种通常可以报为糠秕马拉色菌复合体成员。厚皮马拉色菌(*Malassezia pachydermatis*)，引起动物耳部感染和偶发人类医源性真菌血症，不被认为是糠秕马拉色菌复合体成员。如报告，需要报告其种名。它与糠秕马拉色菌复合体的最显而易见的区别是它可以在普通培养基上生长，例如，沙保琼脂培养基(详见下面糠秕马拉色菌培养说明)。据调查，除了导管相关感染外，它从人体皮肤分离出时无临床意义。

花斑癣病变表现为有鳞屑，连续或不连续的色素减退或色素增加(淡黄褐色，黄褐色，褐色或红色)的斑疹，主要出现在颈部、躯干和四肢。感染主要限于表皮，当皮肤没有被正常晒黑时更加明显。此病在世界广泛分布：在热带地区，感染率高达 30%～35%；而温带地区的感染率比热带地区低很多，仅占总人口的 1.0%～4.0%。糠秕马拉色菌和相关的酵母菌寄生在正常皮肤，仅在条件适应其过度生长时，引起局部或系统的疾病。

糠秕马拉色菌复合体相关的疾病包括毛囊炎[116]，阻塞性泪囊炎[16]，导致接受静脉脂肪乳剂治疗的患者发生系统性感染和脂溢性皮炎[117]，尤其是 AIDS 患者[118]。已有关于马拉色菌属引起人体感染及这个属的特征的高水平的综述[119-122]。更多

内容的详述见本书第120章。

1. 直接检查 当刮取物置于10%KOH加墨汁[123]、25%NaOH加5%甘油、荧光增白剂或是Kane体系(甘油10 ml,吐温80 10 ml,苯酚2.5 g,甲基蓝1.0 g,蒸馏水480 ml)中时,真菌很容易被观察到。在检查不明来源部位的皮肤碎屑的情况下,Kane体系在真菌染色及鉴别诊断细菌引起的红癣和窝状角质松解症方面具有明显优势(这2种细菌感染,往往与表浅真菌病混淆,主要区别是它们分别引起间擦部和足底的感染)。花斑癣的标志是显微镜下出现"意大利面条"和"肉丸子",即为短的、分节段性、有时有直径2.5~4.0 μm分枝,并且长度不等的索条,有成群的小型单个、椭圆形或圆形、出芽酵母细胞群混杂存在(图126-19)。酵母菌表现为母代与子代细胞间具有囊领(瓶梗式和单极式出芽),细胞大小平均4 μm(最大为8 μm)。



图126-19 花斑癣病灶处皮肤刮取物中的糠秕马拉色菌(Kane染色)。放大倍数,×1000

2. 分离培养 培养对于鉴定来说并不是必需的,除非直接镜检发现形态不典型,或以鉴定到精确的种为研究目的。而且,糠秕马拉色菌复合体是皮肤正常菌群的一部分,阳性培养结果不能证明感染。这些菌种在普通的真菌培养基上不能生长,需外源的脂类。培养时,可将刮取物接种于Leeming-Notman培养基,以全脂牛奶作为主要脂类来源[124],或接种在Dixon琼脂[125],或接种在改良的Dixon琼脂上,其成分包含麦芽提取物(3.6%)、蛋白胨(Oxoid)(0.6%)、牛胆汁粉(胆汁盐;Oxoid)(2%)、吐温40(1%)、甘油(0.2%)、油酸(0.2%)和琼脂(1.2%)。酵母菌生长缓慢,菌落为乳白色,光滑或粗糙,突起(图126-20),后期变为模糊的、干燥的、黄褐色至褐色。在培养中通常只出现发芽酵母细胞(图126-21)。



图126-20 在涂油的利特曼牛胆汁琼脂上的糠秕马拉色菌培养物



图126-21 覆盖橄榄油的利特曼牛胆汁琼脂上培养的糠秕马拉色菌酵母细胞的显微形态。放大倍数,×400

(二)黑癣

黑癣以外观表现为特点,主要出现在手掌部,较少出现在脚背部,平整、有尖锐边缘、黑褐色、无鳞状斑点,类似于黑色素瘤[122]。

病变通常是由威尼克何德霉(*Hortaea werneckii*)[威尼克暗色枝顶孢(*Phaeoannellomyces werneckii*)、威尼克外瓶霉(*Exophiala werneckii*)或威尼克枝孢霉(*Cladosporium werneckii*)]引起

的。主要发生在热带地区[126]，在美国东南及附近沿海地区偶有发现[122,127]。流行地区以外的诊断病例，主要来自曾去往美国热带地区和加勒比岛屿的旅游者[126]。威尼克何德霉属于子囊菌类归于座囊菌目(Dothideales)[128]。

1. 直接镜检 皮肤刮取物放在KOH或NaOH中显微镜下镜检会发现大量亮褐色、频繁分枝具有隔膜的直径1.5～5.0 μm的菌丝(图126-18h)；短而弯曲的菌丝和出芽细胞，一些具有隔膜。

2. 分离 在含或不含抗生素的SGA上，威尼克何德霉生长缓慢，通常2～3周内为湿润的、亮橄榄色到黑绿色的酵母状菌落。类酵母细胞在繁殖中通常呈双细胞形态而不是出芽，从粗的(直径高达2 μm)、明显的环痕间距处(多层环绕像带了很多手镯)产生子代酵母细胞。在7天或更久后，菌落可以形成一层厚厚的、深色、有明显隔膜并带有环状的繁殖结构的菌丝边缘，它们产生的分生孢子与初期的酵母细胞难以区分。威尼克何德霉的微观形态学的详细描述见第127章。

(三)黑发结节病

黑发结节病是一种头皮、头发的真菌感染，较少感染髯或胡须，极少感染腋毛和阴毛。病变特征是呈现不连续的、硬的、颗粒状的深棕色至黑色突起，这些突起紧紧依附于在毛干上(图126-22)。主要在非洲、亚洲、南美洲中部和南部等热带地区流行。引起人和灵长类动物感染[122,126,129]。

人类致病菌是何德结节菌(*Piedraia hortae*)，是一种子囊菌(归为座囊菌目)，发干上的突起为子囊座，其内含有子囊腔，子囊腔中有子囊和子囊孢子。

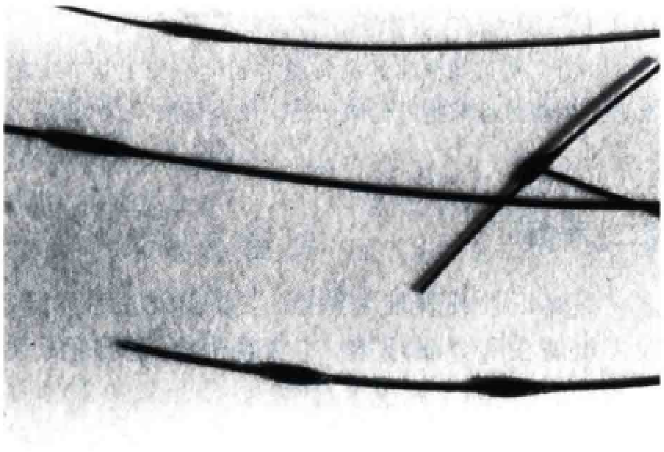


图126-22 头发上黑发结节病的突起，NaOH封片。放大倍数，×100

1. 直接镜检 将有1个或多个黑色突起的头发片段置于25％NaOH或KOH(含5％甘油)中处理。温和加热，轻压玻片，因为突起很硬避免压破盖玻璃片。成熟结节的压片可以看到深色、紧凑的分隔菌丝和圆形或卵圆形子囊，子囊中含有2～8个透明无隔膜的香蕉状(梭形)、有1根或多根附属丝的子囊孢子。制备好的标本片应先置于低倍镜下观察盘绕在头发表面的紧凑菌丝，然后再高倍镜下观察子囊和子囊孢子。

2. 分离、培养和鉴定 当直接镜检观察到子囊孢子时，不必进行培养。另外，分离培养主要使用加入氯霉素的SGA或同时加入氯霉素和放线菌酮的SGA。一些报道指出，放线菌酮可能对该菌有抑制作用，但其他人使用这种抗生素很成功。仅含氯霉素的改良SGA已成功用于该菌的分离。

菌落生长很慢，最初呈现黑褐色到黑色，平滑无毛，后期有黑褐色至黑色的短的气生菌丝覆盖在菌落表面。中央突起外周平整。有些菌落在琼脂上产生红褐色的扩散的色素。镜检只能看到高度分隔的深色菌丝和膨胀的夹层细胞。在普通真菌培养基上很难找到分生孢子和子囊孢子。

(四)白发结节病

白发结节病是真菌侵染发干所致，其特征为头发上有软的、白色的、黄色的、灰棕色或绿色的结节，这些结节主要出现在面部、腋毛或阴毛处(图126-23)，很少出现在头皮、眉毛、睫毛上。结节可以不连续的，但通常是连续的，构成不规则的透明壳。



图126-23 腹股沟毛发上的白发结节病突起。放大倍数，×1000

在北美洲和欧洲呈散发感染，在南美洲、非洲和部分亚洲地区感染更加普遍[126]。虽然白发结节病并非常见感染，但阴毛白发结节病在特定人群中较常见[122,130]。

将黏有突起的头发置于 10% KOH 或 25% NaOH-5%甘油中处理后，用盖玻片压碎进行显微镜检，会发现纠缠的透明的分隔菌丝，菌丝断裂成卵形或长方形的分生节孢子，直径 2～4 μm(图 126-24)，有时可见出芽分生孢子，有时见到菌体包围突起而形成的菌胶团(果冻样团块)。

分离株最初被认为是白吉利毛孢子菌(*Trichosporon beigelii*)或皮肤毛孢子菌(*Trichosporon cutaneum*)，但近期已在多数病例中鉴定为

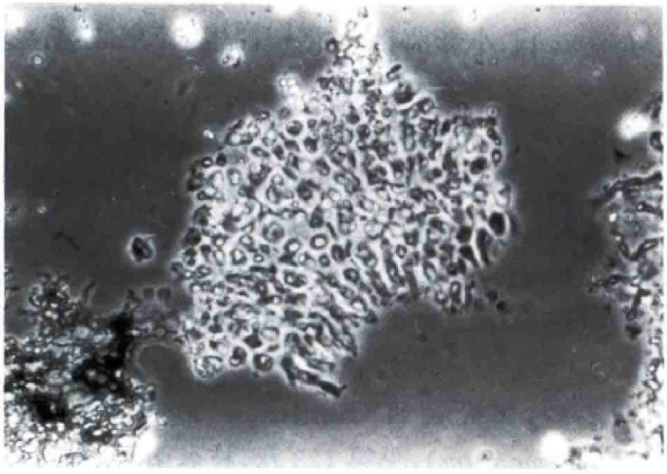


图 126-24　压碎的白发结节病的突起可见分生节孢子。放大倍数，×1000

卵形毛孢子菌(*Trichosporon ovoides*)(引起头皮白发结节病)、皮瘤毛孢子菌(*Trichosporon inkin*)(引起阴毛白发结节病主要因素)和阿萨西毛孢子菌(*Trichosporon asahii*)[131-132]。与糠秕马拉色菌复合体一样，这些物种形成了一个很难识别的复合体。除诊断毛结节菌病(piedra)外，这些物种的区别在皮肤病真菌学中并不具有明确的临床意义。它们也是很常见的皮肤污染菌。除非需要尝试对已证实的病原体进行研究水平的鉴定，在通常情况下，基于出芽酵母细胞产生、分生孢子和脲酶阳性试验，其主要被认为是非中性粒细胞减少的患者皮肤、毛发、指甲上的毛孢子菌属成员。白发结节病病原体用加氯霉素的 SGA 简单分离，或用含抗生素的其他分离培养基。分离培养基不能含有放线菌酮，因为它抑制一些种的生长。这些菌株生长迅速，菌落为白色到乳白色，菌落形态因不同种而各异。关于引起该病的这些种属(包括白发结节病)特征描述请参阅 Guého 等[132-133]的文章。关于毛孢子菌属的更多内容见本书第 120 章。

参考文献请扫二维码查阅

第127章 弯孢霉属、外瓶霉属、赛多孢霉属、孢子丝菌属和其他黑色真菌

JOSEP GUARRO, HUGO MADRID, SYBREN DE HOOG

(付英梅 译;徐和平、陆玲 审校)

本章涉及的真菌大部分为暗色丝孢菌病(phaeohyphomycosis)、着色芽生菌病(chromoblastomycosis)和孢子丝菌病(sporotrichosis)的致病真菌,还包括一部分引起浅表皮肤感染的真菌。这些真菌在分类上属于子囊菌的以下各目:葡萄座腔菌目(Botryosphaeriales)[色二孢属(*Lasiodiplodia*)、壳球孢属(*Macrophomina*)和新柱顶孢(*Neoscytalidium*)]、美球菌目(Calosphaeriales)[(斜嘴座壳属(*Pleurostoma*)]、煤炱目(Capnodiales)[枝孢霉属(*Cladosporium*)和何德菌属(*Hortaea*)]、次盾炱目(Chaetothyriales)[花霉属(*Anthopsis*)、关节枝孢霉属(*Arthrocladium*)、枝孢瓶霉属(*Cladophialophora*)、杯梗孢属(*Cyphellophora*)、外瓶霉属(*Exophiala*)、着色霉属(*Fonsecaea*)、努夫菌属(*Knufia*)、瓶霉属(*Phialophora*)、喙枝孢属(*Rhinocladiella*)和维罗纳霉属(*Veronaea*)]、间座壳目(Diaporthales)[间座壳属(*Diaporthe*)]、座囊菌目(Dothideales)[短梗霉属(*Aureobasidium*)和索状霉属(*Hormonema*)]、小囊菌目(Microascales)[*Knoxdaviesia* 属、小囊菌属(*Microascus*)、赛多孢霉属(*Scedosporium*)、帚霉属(*Scopulariopsis*)和 *Triadelphia* 属]、长喙壳目(Ophiostomatales)[长喙壳属(*Ophiostoma*)和孢子丝菌属(*Sporothrix*)]、格孢腔目(Pleosporales)[链格孢属(*Alternaria*)、离蠕孢属(*Bipolaris*)、弯孢霉属(*Curvularia*)、明脐菌属(*Exserohilum*)和香港丝状菌属(*Hongkongmyces*)]、粪壳菌目(Sordariales)[单孢瓶霉属(*Phialemonium*),见第123章,枝鼻菌属(*Cladorrhinum*),"丝葚霉属"(*Papulaspora*)]、Togniniales 目[暗色枝顶孢属(*Phaeoacremonium*)]和黑星菌目(Venturiales)[赭霉属(*Ochroconis*)和疣霉属(*Verruconis*)](表127-1)。相应真菌学的术语已在本书第116章中介绍。

表127-1 本章涉及的临床常见真菌及其分类归属

目、属、种名	已废弃旧名(包括最近应用单一命名法后不再使用的有性或无性型名称)
葡萄座腔菌目(Botryosphaeriales)	
柯柯豆毛色二孢(*Lasiodiplodia theobromae*)	腐生葡萄座腔菌(*Botryodiplodia theobromae*),柯柯豆双孢菌(*Diplodia theobromae*)
菜豆壳球孢(*Macrophomina phaseolina*)	菜豆大茎点霉(*Macrophoma phaseolina*),*Tiarosporella phaseolina*
双间新柱顶孢(*Neoscytalidium dimidiatum*)	透明柱顶孢(*Scytalidium hyalinum*),圆酵母汉德逊霉(*Hendersonula toruloidea*),双间柱顶孢(*Scytalidium dimidiatum*)
美球菌目(Calosphaeriales)	
斜嘴座壳属(*Pleurostoma*)	
匍匐斜嘴座壳(*P. repens*)	匍匐瓶霉(*Phialophora repens*),*Pleurostomophora repens*
P. richardsiae	烂木瓶霉(*Phialophora richardsiae*),*Pleurostomophora richardsiae*
P. ochraceum	*Pleurostomophora ochracea*

（续 表）

目、属、种名	已废弃旧名（包括最近应用单一命名法后不再使用的有性或无性型名称）
煤炱目（Capnodiales）	
枝孢霉属（*Cladosporium*）	
枝孢样枝孢霉（*C. cladosporioides*）	枝孢样单孢枝霉（*Hormodendrum cladosporioides*），*Cladosporium herbarum f. hormodendroides*
尖孢枝孢霉（*C. oxysporum*）	纤细枝孢霉（*Cladosproium subtile*），*Cladosporium artocarpi*，*Cladosporium sorghi*
假枝孢霉（*C. pseudocladosporioides*）	
球形枝孢霉（*C. sphaerospermum*）	
耐盐枝孢霉（*C. halotolerans*）	
极细枝孢霉（*C. tenuissimum*）	
锥形枝孢霉（*C. subuliforme*）	
威尼克何德霉（*Hortaea werneckii*）	威尼克外瓶霉（*Exophiala werneckii*），*Phaeoannellomyces werneckii*
次盾炱目（Chaetothyriales）	
三角花霉（*Anthopsis deltoidea*）	
暴发关节枝孢霉（*Arthrocladium fulminans*）	
枝孢瓶霉属（*Cladophialophora*）	
Arxii 枝孢瓶霉（*C. arxii*）	
斑替枝孢瓶霉（*C. bantiana*）	*Xylohypha bantiana*，*Cladosporium trichoides*
C. boppii	*Taeniolella boppii*
卡氏枝孢瓶霉（*C. carrionii*）	卡氏枝孢霉（*Cladosporium carrionii*）
德夫利枝孢瓶霉（*C. Devriesii*）	德夫利枝孢霉（*Cladosporium devriesii*）
C. emmonsii	*Xylohypha emmonsii*
C. immunda	
谦逊枝孢瓶霉（*C. modesta*）	
足菌肿枝孢瓶霉（*C. mycetomatis*）	
萨摩亚枝孢瓶霉（*C. samoënsis*）	
土星形枝孢瓶霉（*C. saturnica*）	
杯梗孢属（*Cyphellophora*）	
欧洲杯梗孢（*C. europaea*）	欧洲瓶霉（*Phialophora europaea*）
镰状杯梗孢（*C. fusarioides*）	镰状假小托菌（*Pseudomicrodochium fusarioides*）
条裂杯梗孢（*C. laciniata*）	
C. ludoviensis	
多隔杯梗孢（*C. pluriseptata*）	
C. suttonii	*Pseudomicrodochium suttonii*
外瓶霉属（*Exophiala*）	
亚洲外瓶霉（*E. asiatica*）	
狭窄外瓶霉（*E. attenuata*）	
伯杰外瓶菌（*E. bergeri*）	
坎贝外瓶霉（*E. campbellii*）	
皮炎外瓶霉（*E. dermatitidis*）	*Wangiella dermatitidis*
马外瓶霉（*E. equina*）	*Haplographium debellae-marengoi var. equinum*
香港外瓶霉（*E. hongkongensis*）	
甄氏外瓶霉（*E. jeanselmei*）	甄氏圆酵母（*Torula jeanselmei*）
寡育外瓶菌（*E. oligosperma*）	*Melanchlenus oligospermus*
暗色砖格外瓶菌（*E. phaeomuriformis*）	暗色砖格格孢霉（*Sarcinomyces phaeomuriformis*）

（续 表）

目、属、种名	已废弃旧名（包括最近应用单一命名法后不再使用的有性或无性型名称）
多形外瓶霉（*E. polymorpha*）	
棘状外瓶霉（*E. spinifera*）	棘状瓶霉（*Phialophora spinifera*）
毒物外瓶霉（*E. xenobiotica*）	
着色霉属（*Fonsecaea*）	
单孢着色霉（*F. monophora*）	
努比着色霉（*F. nubica*）	
多形着色霉（*F. multimorphosa*）	
裴氏着色霉（*F. pedrosoi*）	裴氏单孢枝霉（*Hormodendrum pedrosoi*），紧密着色霉（*Fonsecaea compacta*）
F. pugnacius	
表皮努夫菌（*Knufia epidermidis*）	*Coniosporium epidermidis*
瓶霉属（*Phialophora*）	
美洲瓶霉（*P. americana*）	半浸刺壳腔菌（*Capronia semiimmersa*）
中国瓶霉（*P. chinensis*）	
椭圆瓶霉（*P. ellipsoidea*）	
膨大瓶霉（*P. expanda*）	
大孢瓶霉（*P. macrospora*）	
迟缓瓶霉（*P. tarda*）	
疣状瓶霉（*P. verrucosa*）	
喙枝孢属（*Rhinocladiella*）	
麦肯兹喙枝孢（*R. mackenziei*）	麦肯兹枝绿霉（*Ramichloridium mackenziei*）
R. basitona	*Ramichloridium basitonum*
播水喙枝孢（*R. aquaspersa*）	播水剑顶霉（*Acrotheca aquaspersa*）
热带喙枝孢（*R. tropicalis*）	
模仿喙枝孢（*R. similis*）	
Veronaea botryosa	
间座壳目（Diaporthales）	
间座壳属（*Diaporthe*）	
D. bougainvilleicola	叶子花生拟茎点霉（*Phomopsis bougainvilleicola*）
D. phaseolorum	*Phomopsis phaseoli*
D. phoenicicola	*Phomopsis phoenicicola*
D. longicolla	*Phomopsis longicolla*
座囊菌目（Dothideales）	
短梗霉属（*Aureobasidium*）	
出芽短梗霉（*Aureobasidium pullulans*）	*Discosphaerina fulvida*?[a]
产黑色素短梗霉（*A. melanogenum*）	出芽短梗霉产黑色素变种（*Aureobasidium pullulans var. melanogenum*）
Hormonema dematioides	*Sydowia polyspora*?
小囊菌目（Microascales）	
Knoxdaviesia dimorphospora	
多育节荚孢霉（*Lomentospora prolificans*）	多育赛多孢霉（*Scedosporium prolificans*），多孔赛多孢霉（*Scedosporium inflatum*）
小囊菌属（*Microascus*）	
泡状小囊菌（*M. alveolaris*）	
布鲁尼孢子小囊菌（*M. brunneosporus*）	
钟形小囊菌（*M. campaniformis*）	
灰白小囊菌（*M. cinereus*）	灰白帚霉（*Scopulariopsis cinerea*）

（续 表）

目、属、种名	已废弃旧名（包括最近应用单一命名法后不再使用的有性或无性型名称）
硬化小囊菌(*M. cirrosus*)	
M. croci	
纤细小囊菌(*M. gracilis*)	
交错小囊菌(*M. intricatus*)	
M. paisi	
疣状小囊菌(*M. verrucosus*)	
赛多孢霉属(*Scedosporium*)	
尖端赛多孢霉(*S. apiospermum*)	尖端单孢菌(*Monosporium apiospermum*)
桔黄赛多孢霉(*S. aurantiacum*)	
波氏赛多孢霉(*S. boydii*)	波氏假阿利什霉(*Pseudallescheria boydii*)
S. dehoogii	
帚霉属(*Scopulariopsis*)	
车叶草帚霉(*S. asperula*)	
短帚霉(*S. brevicaulis*)	短小囊菌(*Microascus brevicaulis*)
布朗帚霉(*S. brumptii*)	
念珠帚霉(*S. candida*)	
S. cordiae	
Thiadelphia	
T. desseminata	
T. pulvinata	
长喙壳目(Ophiostomatales)	
孢子丝菌属(*Sporothrix*)	
巴西孢子丝菌(*S. brasiliensis*)	
智利孢子丝菌(*S. chilensis*)	
球形孢子丝菌(*S. globosa*)	
卢里孢子丝菌(*S. luriei*)	申克孢子丝菌卢里变种(*Sporothrix schenckii* var. *luriei*)
苍白孢子丝菌(*S. pallida*)	
申克孢子丝菌(*S. schenckii*)	
云杉长喙壳(*Ophiostoma piceae*)	
格孢腔目 (Pleosporales)	
链格孢(*Alternaria*)	
互格交链链格孢(*A. alternata*)	极细链格孢(*Alternaria tenuissima*)
浸染链格孢(*A. infectoria*)	*Lewia infectoria*
米离蠕孢 (*Bipolaris oryzae*)	
弯孢霉属(*Curvularia*)	
美洲弯孢霉(*C. americana*)	
澳大利亚弯孢霉(*C. australiensis*)	澳大利亚离蠕孢(*Bipolaris australiensis*)，澳大利亚旋孢腔菌(*Cochliobolus australiensis*)，*Drechslera australiensis*
厚垣弯孢霉(*C. chlamydospora*)	
夏威夷弯孢霉(*C. hawaiiensis*)	夏威夷离蠕孢(*Bipolaris hawaiiensis*)，夏威夷旋孢腔菌(*Cochliobolus hawaiiensis*)，*Drechslera hawaiiensis*
人弯孢霉(*C. hominis*)	
C. muehlenbeckiae	
长穗弯孢霉(*C. spicifera*)	长穗离蠕孢(*Bipolaris spicifera*)，*Drechslera spicifera*，刺状旋孢腔菌(*Cochliobolus spicifer*)

（续 表）

目、属、种名	已废弃旧名（包括最近应用单一命名法后不再使用的有性或无性型名称）
膝曲弯孢霉（*C. geniculata*）	膝曲旋孢腔菌（*Cochliobolus geniculatus*）
新月弯孢霉（*C. lunata*）	月状旋孢腔菌（*Cochliobolus lunatus*）
伪新月弯孢霉（*C. pseudolunata*）	
明脐菌属（*Exserohilum*）	
麦金尼斯明脐菌（*E. mcginnisii*）	
喙明脐菌（*E. rostratum*）	*Setosphaeria rostrata*
长喙明脐菌（*E. longirostratum*）	
足癣香港丝状菌（*Hongkongmyces pedis*）	
粪壳菌目（Sordariales）	
膨胀无毛毛壳菌（*Achaetomium strumarium*）	*Chaetomium strumarium*
毛壳菌属（*Chaetomium*）	
球毛壳菌（*C. globosum*）	
玻璃毛壳菌（*C. perlucidum*）	
Cladorrhinum bulbillosum	马丝葚霉（*Papulaspora equi*）?
马丝葚霉（*Papulaspora equi*）	
倒卵单胞瓶霉（*Phialemonium obovatum*）	
Incertae sedis（粪壳菌纲）	
Phialemoniopsis	弯曲单胞瓶霉（*Phialemonium curvatum*）
P. curvata	
Togniniales 目	
暗色枝顶孢属（*Phaeoacremonium*）	
P. alvesii	
P. amstelodamense	
灰白暗色枝顶孢（*P. griseorubrum*）	
膨胀暗色枝顶孢（*P. inflatipes*）	
P. krajdenii	
微小暗色枝顶孢（*P. minimum*）	
寄生暗色枝顶孢（*P. parasiticum*）	寄生瓶霉（*Phialophora parasitica*）
P. rubrigenum	
P. sphinctrophorum	
缓生暗色枝顶孢（*P. tardicrescens*）	
委内瑞拉暗色枝顶孢（*P. venezuelense*）	
黑星菌目（Venturiales）	
奇异赭霉（*Ochroconis mirabilis*）	
奔马疣霉（*Verruconis gallopava*）	奔马赭霉（*Ochroconis gallopava*），*Dactylaria gallopava*，*D. constricta* var. *gallopava*

注：[a] 标有？号的真菌，其命名是否弃用，需进一步明确模式种的特征或结合 DNA 序列分析方可决定

暗色真菌（dematiaceous）通常指具有棕色菌丝（含黑色素）和（或）分生孢子的真菌[1]，但这些真菌与次盾臭目在许多方面都截然不同，故在医学真菌学中，暗色真菌仅指格孢腔目中那些快速生长的种属。Phaeoid 指棕色菌丝，“暗色丝孢菌病”泛指由霉菌引起的一类感染，病灶中可见棕色酵母样细胞、假菌丝、菌丝或这些成分的混合物[2]。感染组织中罕见分生孢子[3]。“黑酵母及相关的真菌”一般专指次盾臭目和座囊菌目的真菌。黑酵母并非真正的真菌分类群，它实际上包括众多不同种类黑素化的子囊菌和担子菌，这些真菌在生活周期的某一阶段可产生芽生的酵母

样细胞[2,4]。

多形性(pleoanamorphism)即多种不同的形态类型,是黑酵母、赛多孢霉属和 *Triadelphia* 属成员的显著生物学特征[2,5]。在临床实验室培养条件下,这些真菌能产生多种无性繁殖的细胞形式,称为"共无性型"(synanamorphs 或 synasexual morphs)。过去常将真菌不同的共无性型单独命名,造成命名系统的混乱。并且,有的真菌在生长的不同阶段会分别形成有性型和无性型,也常被各自赋名,由此更进一步加剧了真菌命名和分类系统的冗余复杂性[1-2]。当今,真菌分类学正经历重要变革,随着"一种真菌、一种名称"或"单一命名法"理念的应用,应去繁从简,优先采用沿用最久或范围最广的名称,逐步过渡到一种真菌只对应一个名称的分类体系[6]。对于真菌独立增殖的无性繁殖形式,描述时仅保留其属名,不再赋予它特定的分类学名称。与临床密切相关的真菌中,只有一小部分在实验室培养时产生有性型(teleomorph),其特点是通过减数分裂形成子实体,且每个真菌只有一个有性形式[2]。

一、病原体的分类和描述

(一)葡萄座腔菌目(Botryosphaeriales)

1. 色二孢属(*Lasiodiplodia*) 色二孢属是一种植物致病的腔孢属,其特征是无性分生孢子外面包裹一层较厚的外壁,形成球形子实体。分生孢子初期为透明椭圆形,后逐渐变成棕色并在成熟时形成中隔。柯柯豆毛色二孢(*Lasiodiplodia theobromae*)[曾用名:柯柯豆毛色二球孢菌(*Botryodiplodia theobromae*)](图127-1)是唯一一个研究较多的与人类疾病有关的种[7-9]。

2. 壳球孢属(*Macrophomina*) 菜豆壳球孢(*Macrophomina phaseolina*)是一种广泛分布的植物病原真菌,影响多种重要的经济作物。它偶尔也感染免疫功能低下的人群。在植物组织上生长时,这个真菌产生深色的菌核和分生孢子器(含有产孢细胞的球状或瓶状结构),但临床分离株在培养时只产生黑色的菌丝和菌核。因此,本物种的鉴定主要依靠 DNA 序列分析[10-11]。

3. 新柱顶孢属(*Neoscytalidium*) 双间新柱顶孢(*Neoscytalidium dimidiatum*)[原名双间柱顶孢(*Scytalidium dimidiatum*)]是植物致病真菌,与人类的多种感染、特别是皮肤和指甲的感染有关[2]。人工培养时,双间新柱顶孢能产生关节孢子,在合适的生长条件下,有些分离株能形成分生孢子器。过去一直把这个真菌的腔孢纲无性型看作是"芒果纳特拉斯酵母菌(*Nattrassia mangiferae*)",以前称为圆酵母汉德逊霉(*Hendersonula toruloidea*)。然而,分子研究显示,双间新柱顶孢和芒果纳特拉斯酵母菌是两个不同的种,后者是新壳梭孢属(*Neofusicoccum*)的成员[10,12]。

真菌多腔的子实体内含透明、椭圆形的分生孢子,一部分变为褐色,有1或2个横隔。培养时常出现一种生长快速、乌黑色、带有深色关节孢子的无性型(图127-1)。分生孢子器仅见于在湿润的植物叶片或贫营养培养基上生长了2个月的真菌。双间新柱顶孢还有一种无黑色素突变株,其分生孢子产生的数量较少,最近被认定为是一个新种——透明新柱顶孢(*Neoscytalidium hyalinum*)[即透明柱顶孢(*Scytalidium hyalinum*)][13]。

(二)美球菌目(Calosphaeriales)

以前的瓶霉属(*Phialophora*)中有一些瓶梗黑色的真菌,分子鉴定将它们从瓶霉属移出、归入美球菌目。美球菌目中只有这部分真菌与临床有关,而其他绝大部分成员是植物相关致病真菌。人类的感染多由外伤引起,病原体可能直接来源于真菌栖息的木本植物[14]。

斜嘴座壳属(*Pleurostoma*) 该属真菌主要寄生在木头上。菌丝暗色,瓶梗苍白色、顶端尖细,可单个或聚集成浓密的刷状;透明、黏稠的分生孢子在或小或大的囊领上着生。匍匐斜嘴座壳(*Pleurostoma repens*)偶见于人类皮下真菌感染。第二个与人类感染相关的种是 *Pleurostoma richardsiae*,为木头中一种软腐真菌(图127-2)(旧称烂木瓶霉)[14]。最近公开报道的 *Pleurostoma ochracea* 是一种比较特殊的真菌,可在足菌肿病灶中产生黄色颗粒,而此前一度认为这种黄色颗粒是细菌感染所特有[15]。斜嘴座壳的真菌曾一直沿用它们的无性型名称"*Pleurostomophora*"[14],最近单一命名体系中把这些真菌归在其有性型属名——斜嘴座壳中[16]。

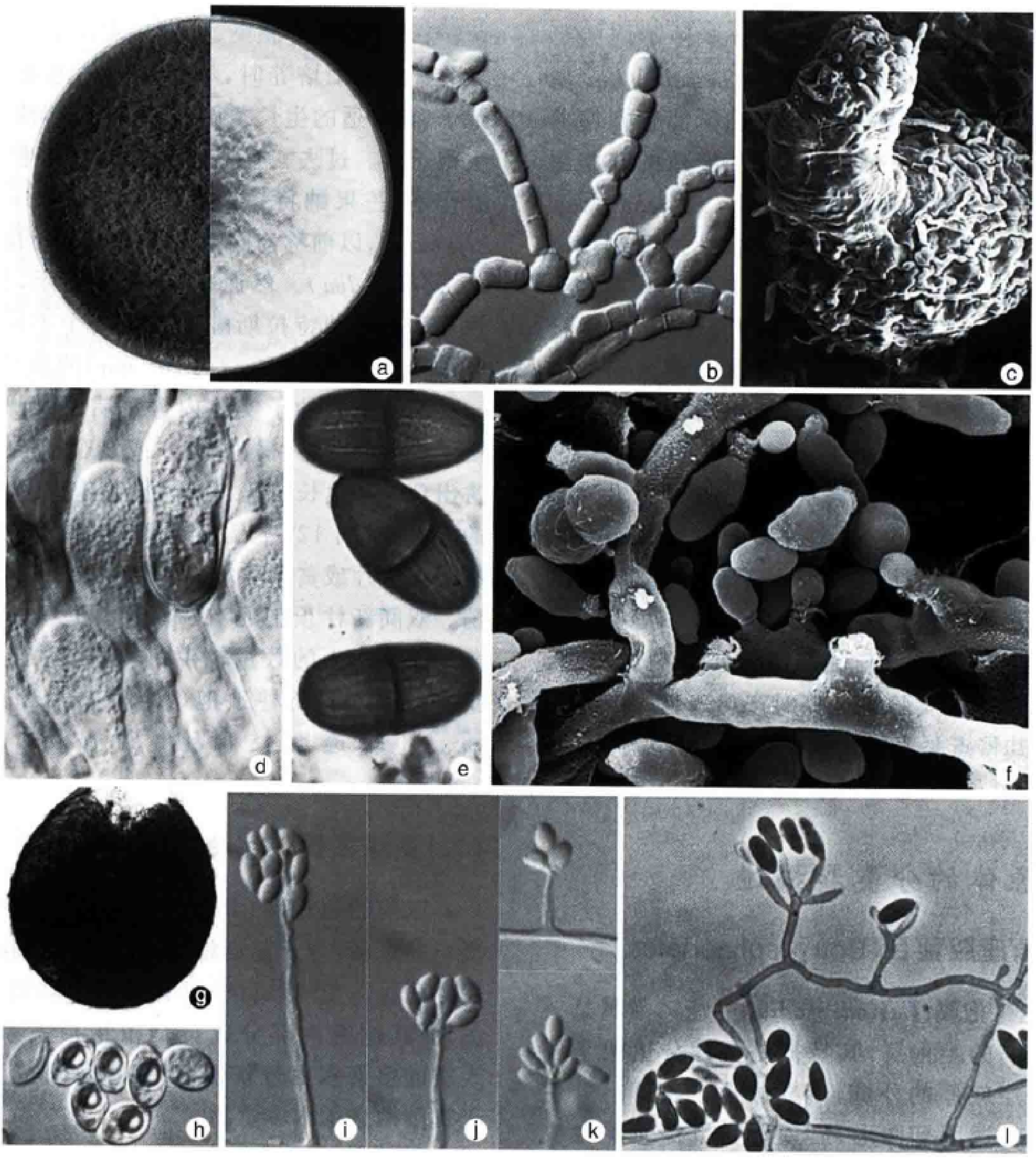


图 127-1 a,b. 双间新柱顶孢(*Neoscytalidium dimidiatum*);c～e. 柯柯豆毛色二孢(*Lasiodiplodia theobromae*);f. 威尼克何德霉(*Hortaea werneckii*);g,h. 波氏赛多孢霉(*Scedosporium boydii*)有性型;i～l. 波氏赛多孢霉(*Scedosporium boydii*)无性型。引自参考文献[2]

(三)煤炱目(Capnodiales)

1. 枝孢霉属(*Cladosporium*) 枝孢霉属的成员在空气中最常见,是临床实验室极其常见的污染菌,也是常见的过敏原,例如,枝孢样枝孢霉(*Cladosporium cladosporioides*)(图 127-3)、尖孢枝孢霉(*C. oxysporum*)和球形枝孢霉(*C. sphaerospermum*)[2]。该属的特征是在单细胞或有隔的分生孢子顶端形成有分枝的链,有深色瘢痕;培养时很少产生有性状态。近年也出现了若干枝孢霉样的属,但真正的枝孢霉具有一圈特征性的边缘,文献将其描述为加冠的瘢痕[17]。枝孢霉属的真菌可从土壤、植物和水中分离,有时也是人类的条件致病菌。因感染非常罕见,所以一旦分离,必须彻底评估以明确其临床意义。de Hoog 等[2]在著作中描述了几种可能与人类感染相关的枝孢霉。最近,用多位点测序和形态学的方法,从美国多种临床样本中鉴定了所分离的 92 种枝孢霉[18]。最常见的种是耐盐枝孢霉(*C. halotolerans*)、极细枝孢霉(*C. tenuissimum*)

和假枝孢霉(*C. pseudocladosporioides*)。

2. 何德菌属(*Hortaea*)　何德菌属的成员具有特别粗大的菌丝，可形成丰富的隔膜，从比较宽大的破裂处环痕产孢[2]。嗜盐的种威尼克何德霉(*H. werneckii*)(图 127-1)寄居于亚热带海滨的海水、软体动物、蒸发池和其他盐分较多的环境中，导致人类的浅表感染。这些真菌的显著特征是产生有隔或无隔的类酵母样结构[19]。临床感染常表现为掌黑癣(tinea nigra)[2](第 126 章)。从泰国地区蒲桃的叶子中分离得到了本属的另一个种泰国何德霉(*H. thailandica*)[20]。

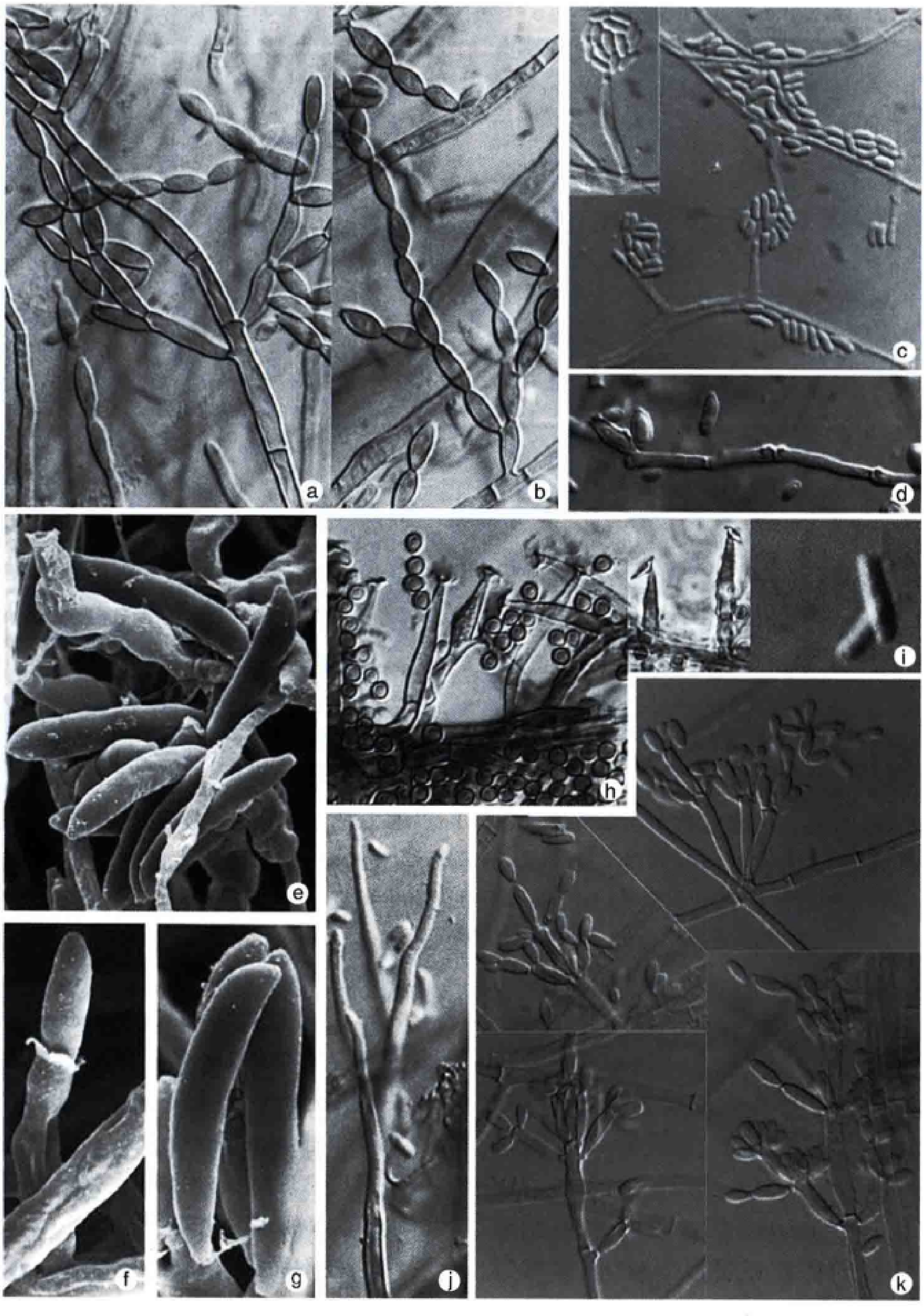


图 127-2　a，b. 斑替枝孢瓶霉(*Cladophialophora bantiana*)；c. *Phialemoniopsis curvata*；d. 皮炎外瓶霉(*Exophiala dermatitidis*)；e～g. 多隔杯梗孢菌(*Cyphellophora pluriseptata*)；h，i. *Pleurostoma richardsiae*；j. 寄生暗色枝顶孢(*Phaeoacremonium parasiticum*)；k. 裴氏着色霉(*Fonsecaea pedrosoi*)的不同图片。引自参考文献[2]

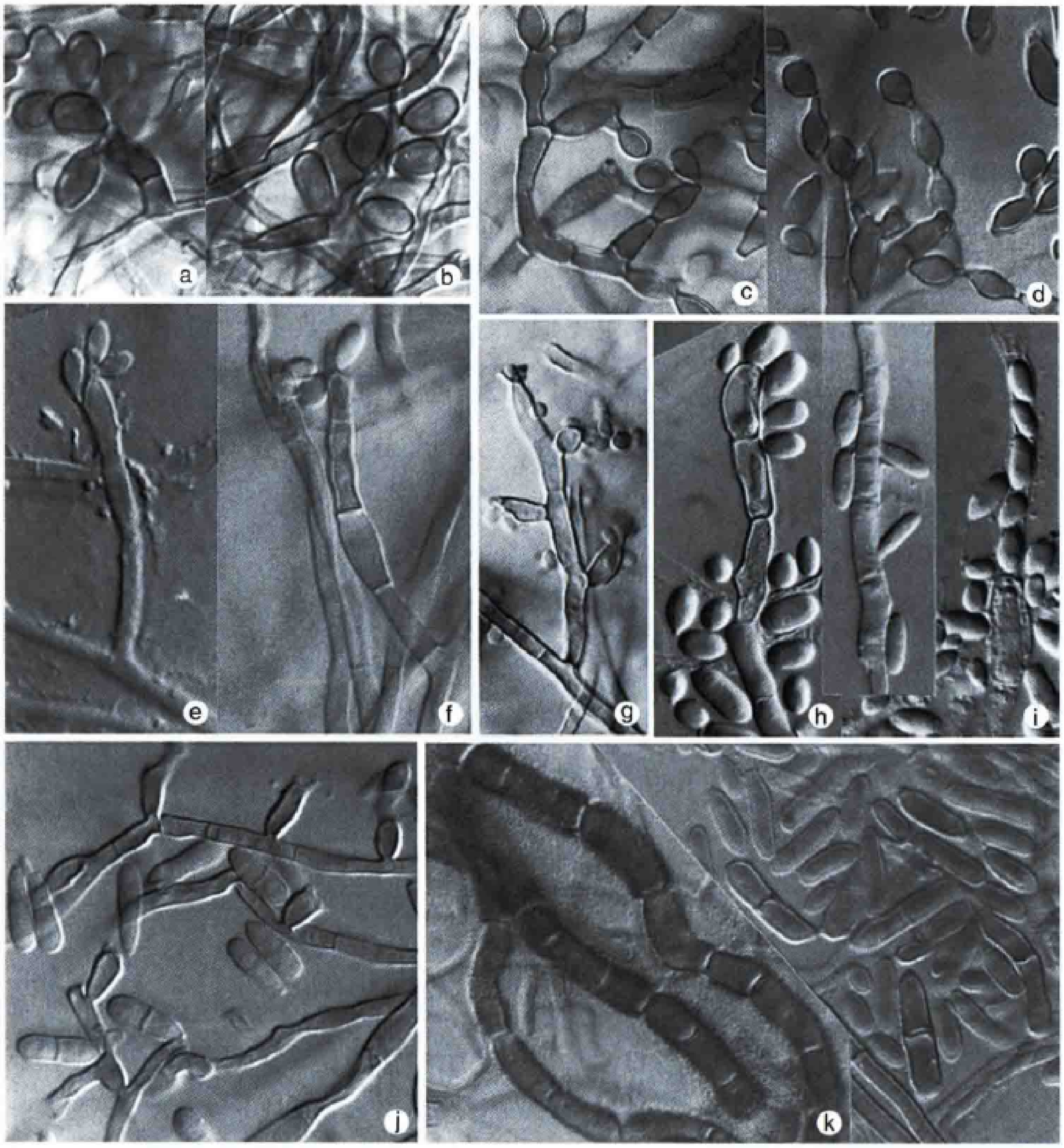


图 127-3 a,b. 麦肯兹喙枝孢(*Rhinocladiella mackenziei*);c,d. 枝孢样枝孢霉(*Cladosporium cladosporioides*);e,f. 播水喙枝孢(*Rhinocladiella aquaspersa*);g. 疣状瓶霉(*Phialophora verrucosa*);h,i. 出芽短梗霉(*Aureobasidium pullulans*);j. 奔马疣霉(*Verruconis gallopava*);k. *Hormonema dematioides*。引自参考文献[2]

(四)次盾贠目(Chaetothyriales)

次盾贠目成员较少,多数都能感染人[2]。尽管它们在自然界广泛分布,但生长缓慢,很难从环境样本中分离[21]。

1. 花霉属(*Anthopsis*) 本属真菌种类较少,多数具有特殊的倒置壶腹形瓶梗,囊领靠近基底部。模式种是土壤中的三角花霉(*A. deltoidea*),具有三角形的分生孢子[22]。曾有1例三角花霉引起鹰嘴滑囊炎的报道[23],但后来的分子研究显示,这一临床分离株实际上为花霉属的另一新成员[24]。

2. 关节枝孢霉属(*Arthrocladium*) 目前本属主要有4个种,大多分布在植物和蚁巢中。暴发关节枝孢霉(*A. fulminans*)分离自免疫力降低的患者和健康人群。培养时不产生分生孢子,但可观察到念珠状菌丝和厚垣孢子样结构。其鉴定依赖于DNA序列比较[25-26]。

3. 枝孢瓶霉(*Cladophialophora*) 枝孢瓶霉的特征是干燥的分生孢子呈链状连接,常无深色瘢痕,分生孢子梗通常不分枝。本属包含11个病原真菌(表127-1),虽然土壤和植物中可分离到枝孢瓶霉[21,27],但它们引起的感染大多限于人类和其他温血动物[2,27-28]。班替枝孢瓶霉(*Cladophi-*

alophora bantiana）和卡氏枝孢瓶霉（*C. carrionii*）最为重要。班替枝孢瓶霉是一种嗜神经的霉菌，分生孢子链很长、几乎不分枝，可在40 ℃生长（图127-2，图127-5），能引起健康人中枢神经系统的暗色丝孢菌病和其他感染[2]。其核糖体操纵子小亚基（small-subunit，SSU）1768bp处有一个558bp的独特内含子[29]。卡氏枝孢瓶霉是着色芽生菌病的常见病原体，具有呈链状排列、含丰富分枝的小分生孢子，偶有呈瓶梗状的共无性型[2]。de Hoog[2]和Badali[27-28]等研究了几种与临床感染相关的枝孢瓶霉，它们形态相近。最近新发现的几个枝孢瓶霉的环境物种，在形态上与对人致病的枝孢瓶霉也极为相似[21,30]。因此，只能通过DNA序列分析对这些枝孢瓶霉进行鉴定。

4. 杯梗孢属（*Cyphellophora*） 杯梗孢属[包括之前临床上曾归为假小托菌属（*Pseudomicrodochium*）的种]是定植于土壤、植物和河床沉积物中一种罕见的瓶梗状的丝状真菌[21,31]。其特征为分生孢子柔软弯曲、横向分隔[2]。一些具有单细胞分生孢子的瓶霉属样真菌，与本属聚成一个分类簇，最近被归入杯梗孢属[21,32]。这些真菌属于杯梗孢科（Cyphellophoraceae），而瓶霉属是猴头菌科（Herpotrichiellaceae）的成员[33]。培养时黑色素分布均匀，很少扩散生长。分生孢子沿菌丝由发育不良的囊领产生，但也可见分散的瓶梗。临床相关的种偶可引起浅部真菌病，例如，欧洲杯梗孢（*Cyphellophora europaea*）、条裂杯梗孢（*Cyphellophora laciniata*）、多隔杯梗孢（*C. pluriseptata*）和*C. reptans*（图127-2）[2]。有报道称*Cyphellophora suttonii*可引起狗的皮下感染[34]，也可能是人类呼吸道感染的一种病原体[35]。最近发现了1例由*Cyphellophora ludoviensis*引起的着色芽生菌病[36]。这些真菌感染的发病率可能很低，临床上容易漏诊。

5. 外瓶霉属（*Exophiala*） 外瓶霉属是与临床相关的黑酵母中的主要真菌。真菌分离株的形态呈高度多样性。分离株起初多为酵母样菌体，而后形成规则的菌丝和串珠样丝状体。因此，随着培养时间延长，菌落由初期的湿润黏滑状转为成熟的柔软长毛状。自菌丝的侧支或末端形成环痕梗，以环痕方式产孢[4]。有时可见缓慢生长的分生组织形态（"*Sarcinomyces*"）[2,37]。在营养缺陷培养基中，新分离菌株的孢子常松散或紧密地排列为链状，瓶梗上有巨大领口状结构[4,38]。临床最常鉴定到的种包括皮炎外瓶霉（*Exophiala dermatitidis*）（图127-2）和广义的甄氏外瓶霉（*E. jeanselmei sensu lato*），后者根据分子特征又被进一步分为若干分类群，如寡育外瓶菌（*E. oligosperma*）、伯杰外瓶霉（*E. bergeri*）和毒物外瓶霉（*E. xenobiotica*），它们从形态上无法区分[39-40]。皮炎外瓶霉的典型形态是瓶梗无领口状结构，宽而短的瘢痕区含有分生细胞。皮炎外瓶霉的另一显著特征是在40 ℃生长，不能同化硝酸盐[41]。而与皮炎外瓶霉类似的暗色砖格外瓶菌（*E. phaeomuriformis*），最高生长温度为38℃[37]。棘状外瓶霉（*E. spinifera*）不太常见，其特点是分生孢子梗大而直[2]。最近又描述了一个类似的种，即狭窄外瓶霉（*E. attenuate*），该真菌产孢细胞较少[39]。DNA序列分析是对外瓶霉进行鉴定的有效工具。

6. 着色霉属（*Fonsecaea*） 目前，着色霉属包括5个对人致病的种，普遍特征是干燥的分生孢子紧密不一地排列成链，通常为短链。培养时大多只有一种形态，但有时可形成瓶霉属样带有领口状结构的瓶梗和喙枝孢属样的合轴产孢的分生孢子梗。常规培养基中无芽生细胞。裴氏着色霉（*Fonsecaea pedrosoi*）[图127-2，包括其突变体紧密着色霉（*F. compacta*）]是人类着色芽生菌病的主要病原体之一。单孢着色霉（*F. monophora*）和努比着色霉（*F. nubica*）引起暗色丝孢菌病[42-43]，它们在形态上难以分辨，但可用DNA序列分析进行鉴定。最近报道了1例由*F. pugnacius*感染播散到中枢神经系统的着色芽生菌病。值得注意的是，真菌在皮肤中产生分生组织细胞，而在脑组织中形成黑色素菌丝[44]。有病例报道了多形着色霉（*F. multimorphosa*）在猫脑部的感染，培养物中出现类似于枝孢瓶霉属的一种无性形式和厚垣孢子[45]。除了这些与医学相关的物种外，着色霉属还包括一些从植物材料上分离的、腐生的、对人并不致病的分类群，如*F. erecta*和*F. minima*[46]。

7. 努夫菌属（*Knufia*） 大多数努夫菌属的种为岩石和大理石建筑墙壁中的定植菌，它们也可定植在人类皮肤和指甲上。有报道表皮努夫菌（*Knufia epidermidis*），即*Coniosporium epidermidis*，能引起浅表的暗色丝孢菌病[47]。本属真菌

形态高度多样，在培养基中可产生瓶梗、关节孢子、全壁芽生孢子(holoblastic conidia)、内壁芽生孢子(endoconidia)(位于中心的"母细胞"产生分生孢子)和酵母样出芽结构[48]。表皮努夫菌可产生全壁芽生孢子、关节孢子和分生组织细胞[47-48]。

8. 瓶霉属(*Phialophora*) 对于狭义的瓶霉属而言，分生孢子在发育不良的产孢结构中，从瓶梗上离散着生，或间生于菌丝侧孔。瓶领明显，分生孢子为单细胞、近球形、泪滴状或(亚)筒形，聚集成黏液团块。也可见到念珠样菌丝和分生组织细胞。常无酵母细胞，但某些种可见芽殖分生孢子[49]。瓶霉属的分类高度异质，本属的模式种疣状瓶霉(*P. verrucosa*)属于猴头菌科，而广义瓶霉属的很多成员与杯梗孢属近缘，杯梗孢属是 Chaetothyriales 科中分类位置未定的一个属。Réblová 等[32]将瓶霉属的很多成员移入杯梗孢属，并建立了杯梗孢科。最近，Li 等通过种系方法鉴定了狭义瓶霉属的 5 个种[49]。它们与多种寄生环境相关，包括植物碎片、木头、稻草、土壤和煤。这些真菌感染人可形成不同形式的暗色丝孢菌病和着色芽生菌病，偶可造成足菌肿[2,49]。具有暗色、漏斗状瓶领的疣状瓶霉(图 127-1)是本属中最为熟知的种，而美洲瓶霉(*Phialophora americana*)与之最大的不同是瓶领呈花瓶状[33]。在形态上与瓶霉属相似的其他真菌，现已归入诸如 *Cadophora*、*Gaeumannomyces*、暗色枝顶孢属(*Phaeoacremonium*)和斜嘴座壳属中[16,21,50]。

9. 喙枝孢属(*Rhinocladiella*) 喙枝孢属的典型形态特征是在齿突上合轴产孢，分生孢子深色，单细胞非链状，培养时偶尔出现外瓶霉样的芽生细胞[51]。本属包含 5 个对人致病的种：播水喙枝孢(*R. aquaspersa*)(图 127-3)、麦肯兹喙枝孢(*Rhinocladiella mackenziei*)(图 127-3)、*R. basitona*、模仿喙枝孢(*R. similis*)和热带喙枝孢(*R. tropicalis*)，它们是次盾炱目一些具有分类多元性的真菌。据报道墨绿喙枝孢(*R. atrovirens*)能引起 AIDS 患者脑部的暗色丝孢菌病[52]。现代分子研究发现，墨绿喙枝孢的环境分离株仅来自于在北部国家地区出产的松柏类木材。由此推断上述病例的病原体并非墨绿喙枝孢，而是与之近缘的模仿喙枝孢[53]。播水喙枝孢和热带喙枝孢偶可引起着色芽生菌病，后者也可导致暗色丝孢菌病[36,54]。中东地区流行的嗜神经物种麦肯兹喙枝孢，形态上与 *Pleurothecium obovoideum*(以前的 *Ramichloridium obovoideum*)相似。长期以来认为这些真菌是同一个种，但在种系分类上它们属于子囊菌的不同目(*P. obovoideum* 属于粪壳菌目)[51]。据报道，*R. basitona* 可引起人类多种表现形式的暗色丝孢菌病[55]。

10. 维罗纳霉属(*Veronaea*) 包括众多的腐生成员和一个与临床相关的种，即 *V. botryosa*。*V. botryosa* 的产孢结构与喙枝孢属相似，含带小齿的暗色合生轴，但其孢子是单隔孢子[2]。现有多例由 *V. botryosa* 引起的暗色丝孢菌病的报道，绝大多数累及的是皮肤和皮下组织，感染趋向恶化，多与 CARD19 免疫失调有关[56]。

(五)间座壳目(Diaporthales)

间座壳属(*Diaporthe*) 间座壳属的真菌种类众多，涵盖地理分布广泛的植物病原体、植物内生真菌和腐生真菌[57]。虽然在感染中只能鉴定到属的水平[62-63]，但目前已知至少有 4 个对人致病的种，即 *D. bougainvilleicola*、*D. phaseolorum*、*D. phoenicicola* 和 *D. longicolla*[58-61]。报道中常用它们的无性名拟茎点霉属(*Phomopsis*)，但单一命名法倾向于使用其有性型属名，即间座壳属[57]。这些真菌在培养基中可产生带有 2 种类型孢子的分生孢子器，一种孢子为"α 孢子"，即圆形或类纺锤形的孢子，另一种为"β 孢子"，为纤细的弧形或弯曲伸长的孢子[57]。然而，真菌种内会发生形态变异，且某些分离株培养时并不产孢，因此，对它们的物种鉴定通常需用 DNA 序列的信息[61,64]。

(六)座囊菌目(Dothideales)

座囊菌目包含许多腐生真菌，可在水分较少的环境下旺盛生长，例如，糖分含量多的叶子表面，石头、玻璃和潮湿的医疗设备表面[65]。

1. 短梗霉属(*Aureobasidium*) 短梗霉属含众多腐生、黑色酵母样的种，寄生环境多种多样，包括土壤、植物叶子、水、食物和贫营养环境，如岩石和石头遗迹表面[4,66]。出芽短梗霉(*A. pullulans*)和产黑色素短梗霉(*A. melanogenum*)是人类暗色丝孢菌病的病原体，包括轻度的皮肤感染和侵袭性、危及生命的疾病[67]。短梗霉属显著的形态学特征是出芽的酵母样结构、透明薄壁菌丝和有黑色素的厚壁菌丝并存，随时间延长，部分菌

丝上出现深棕色的厚垣孢子。短梗霉属的2种菌丝均可通过芽生同步的方式产孢，有时可见内壁芽生孢子。产黑色素短梗霉能产生大量黑色的关节孢子和暗色的同步发生的分生孢子，在培养初期即形成黑色菌落；出芽短梗霉的典型菌落为粉色，周围可形成放射状的暗色区域，与产黑色素短梗霉的明显差异是常需2周才形成黑色菌落[66]。

2. 索状霉属(*Hormonema*) 据报道，本属的 *H. dematioides* 偶可引起暗色丝孢菌病。真菌在形态上与短梗霉属相似，但产孢方式却不同于短梗霉属的同步产孢，而是向基性产孢，最年幼的分生孢子在基部[2,4]。另外，DNA序列种系分析显示两者为不同的属[68]。

(七)小囊菌目(Microascales)

小囊菌目中，医学相关的重要属有 *Knoxdaviesia* 属、节荚孢霉属、小囊菌属、帚霉属、赛多孢霉属和 *Triadelphia* 属。在最新的种系分类法中，大部分成员的命名都有较大改变。

1. *Knoxdaviesia* 属 目前包括9个种，特征是分生孢子发育良好，棕色、结构简单，顶端带有一轮瓶梗；孢子(近)透明、有隔、筒形或囊状，呈黏液型。有一个种出现过人类感染，即 *K. dimorphospora*。不同于本属的其他真菌，*K. dimorphospora* 的典型特征是瓶梗在未分化菌丝的侧面、孢子呈椭圆形、浅棕色。典型的粗壮棕色分生孢子梗产生顶端钝、基部短的筒状孢子[69]。

2. 节荚孢霉属(*Lomentospora*) 本属包含一个与医学有关的种，多育节荚孢霉(*L. prolificans*)，因其在黏液团中能产生伸长的环痕产孢细胞和倒卵球形的分生孢子，故在早期文献中曾被称作多育赛多孢霉(*Scedosporium prolificans*)(即现在的 *S. inflatum*)[2]。然而，分子研究证明多育节荚孢霉与真正的赛多孢霉属在亲缘关系上相距甚远。两者形态明显不同，多育节荚孢霉产黑色素能力更强，菌落扁平，分生细胞基部膨大。此外，多育节荚孢霉对伏立康唑高耐药[70]。

3. 小囊菌属(*Microascus*) 之前认为小囊菌属是帚霉属的有性形式，但多位点种系分析显示两者在2个明显不同的枝，因此，现在把它们归为2个属。小囊菌属的形态特征是子囊果深棕色或黑色、球状，或带有乳突和发育不全纤细颈部的安瓿形；子囊孢子为单细胞，稻草色或浅棕色，呈肾形、椭圆形、三角形或四边形，有明显的孔口。无性型产生的分生细胞是安瓿形或烧瓶形，环痕区为窄筒状，分生孢子梗单个或刷状排列；分生孢子是单细胞，浅黄色或深棕色；在向基生长的链上，分生孢子可由光滑变得粗糙。之前曾报道本属与一大类临床疾病相关，但最近修正了真菌种系分类后[71]，学者们发现大部分临床株来自呼吸道标本和关节滑膜液。根据修正后的真菌种系分类，与人类感染有关的种包括灰白小囊菌(*M. cinereus*)、纤细小囊菌(*M. gracilis*)、布鲁尼孢子小囊菌(*M. brunneosporus*)和表127-1中列出的其他小囊菌。

4. 帚霉属(*Scopulariopsis*) 典型特征是子囊果为球形或梨状、黑色、带有裂口或乳突，且有明显的颈；子囊孢子是单细胞、呈不对称的宽肾形或月形，有或没有明显的孔口。无性状态的帚霉具有典型环状排列的、带细毛的分生孢子梗，孢子有时也单个或一小簇出现在短茎上；分生孢子为单细胞、透明至棕色、尖顶或圆顶、基部平截，分生孢子壁平滑或粗糙，在干燥的链上呈向基生长[71]。本属中临床相关的种包括车叶草帚霉(*S. asperula*)、短帚霉(*S. brevicaulis*)和念珠帚霉(*S. candida*)，多数感染累及皮肤和指甲，偶有严重的深部感染[2]。临床分离的帚霉及其最近的种属修正情况[71](表127-1)。

5. 赛多孢霉属(*Scedosporium*) 典型特征是菌落灰色、生长迅速、气生菌丝旺盛，分生孢子梗(近)筒形、较长、带有环痕梗；分生孢子为倒卵形，近乎透明，随生长变成棕色。分生孢子也可从未分化的菌丝或短的囊柄上侧生。另外，培养时可见一种无性繁殖状态。传统上把赛多孢霉属的有性型归入假阿利什霉属(*Pseudallescheria*)，它的典型特征是(亚)球形的闭囊壳内含单细胞、纺锤形或椭球形黑色的子囊孢子[2]。旧的双名法给这部分真菌的命名造成了混淆[72-73]，尖端赛多孢霉(*Scedosporium apiospermum*)是赛多孢霉属中一种与临床相关的真菌，曾被看作是波氏假阿利什菌(*Pseudallescheria boydii*)的无性型[2]。但现在认为波氏赛多孢霉(*P. boydii*)和尖端赛多孢霉(*Scedosporium apiospermum*)是2个不同的种，前者为同宗配合，后者为异宗配合。分子研究也证实两者分类不同[72-73]。单一命名法选择了赛多孢霉属的名称，因

此，应将假阿利什霉的一些种并入赛多孢霉属。目前，与临床相关的赛多孢霉包括尖端赛多孢霉、桔黄赛多孢霉（*S. aurantiacum*）、波氏赛多孢霉和 *S. dehoogii* 这几个种，它们与多种类型的暗色丝孢菌病有关，偶可造成足菌肿[2,70,72-73]。

6. *Triadelphia* 属 目前本属包括 17 个种，大部分在培养时产生多种无性型。*Triadelphia* 是多元的一个属，但很多成员的分类还未达到分子水平[74]。在沙特阿拉伯发现了由 *T. pulvinata* 和 *T. disseminata* 2 个种引起的免疫功能正常或免疫功能低下个体的暗色丝孢菌病。这些真菌能产生 3 种共无性型，它们在分生孢子的大小、隔膜类型、内部转录间区序列上有所不同[5,75-76]。

（八）长喙壳目（Ophiostomatales）

长喙壳菌目是植物病原真菌和腐生真菌，成员众多。真菌大多生长在木材上，呈蓝色，其生活周期与节肢动物有关。仅少数是人或动物的致病菌。主要的有性属是长喙壳属[77]。

1. 长喙壳属（*Ophiostoma*） 典型特征是子囊壳近球形、暗色、长颈，子囊产生后迅速消失，从子囊壳的黏液飞沫中释放出透明的子囊孢子。几十年来，人们一直认为长喙壳属和另一种重要的病原丝状真菌——孢子丝菌的亲缘关系很近[78]。多位点种系研究揭示，临床相关的孢子丝菌[包括其模式种申克孢子丝菌（*S. schenckii*）]是庞大的广义长喙壳属支内部的一个亚支。如选择使用“孢子丝菌”这一古老的属名，则需要将 100 多种长喙壳属的成员都移入孢子丝菌属，包括那些经济上重要的植物病原菌。为了避免真菌分类体系的大幅度改变，单一命名法将申克孢子丝菌及其相关真菌保留在孢子丝菌属，而“长喙壳属”被保留为一个含众多真菌的并系名称[77]。其实，与临床相关的长喙壳目真菌，除了云杉长喙霉（*Ophiostoma piceae*）外，都属于狭义的孢子丝菌属，可导致免疫低下患者致死性的侵袭感染。真菌在感染组织中可形成酵母样细胞和有隔菌丝，但有时表现并不明显，真菌在常规的培养基中也有类似结构。有报道真菌可产生厚垣孢子样细胞，并对放线菌酮耐受。本属真菌的种属鉴定须依赖 DNA 序列分析[79]。

2. 孢子丝菌属（*Sporothrix*） 自然环境下或 25 ℃培养时，申克孢子丝菌（*Sporothrix schenckii*）菌丝无色，分生孢子梗分化不良、带有细小锯齿，分生孢子透明、泪滴状、聚集成簇、从菌丝尖端着生，该真菌只有分生孢子呈深色。偶尔产生近球形或伸长的、无柄的分生孢子。在巧克力培养基或脑心浸液培养基等营养培养基中 37 ℃培养时，可转换为稳定的酵母样真菌。少数分离株较难转化为酵母样真菌，需多次传代并延长培养时间。申克孢子丝菌的环境株和临床株也可出现此种转换[2,80-81]。本属真菌引起的疾病被称为孢子丝菌病（sporotrichosis），根据宿主免疫状态的不同，感染可表现为局限性皮损、淋巴管型播散皮损，甚至是播散性的疾病[82]。

最近分子水平的研究表明，广义的申克孢子丝菌是一个包括许多同源种的复合体[83]。表型（无柄、有色素的分生孢子，30 ℃、35 ℃和 37 ℃时的生长；利用蔗糖、棉籽糖和木糖醇的能力）和基因型（钙调蛋白基因序列及其他标记序列）相结合的鉴定方法，可区分不同的种。除了申克孢子丝菌，巴西孢子丝菌（*S. brasiliensis*）、球形孢子丝菌（*S. globosa*）和卢里孢子丝菌（*S. luriei*）也与人类孢子丝菌病有关[81,84]。巴西孢子丝菌是一个克隆株，毒力较强，在巴西出现过大规模流行，通过流浪猫传播[85]。球形孢子丝菌的侵袭力较弱，在亚洲流行，主要感染儿童[86]。卢里孢子丝菌很少见，仅有来自南非、印度和意大利的感染报道[84]。最近，发现了分别感染人角膜和指甲的两个新的孢子丝菌，苍白孢子丝菌（*S. pallida*）和智利孢子丝菌（*S. chilensis*）[87-88]。

（九）格孢腔目（Pleosporales）

格孢腔目的大多数成员产生迅速蔓延的絮状菌落，土豆胡萝卜琼脂等贫营养培养基是分生孢子产生的最佳条件。分生孢子较大，容易在立体显微镜下呈现。分生孢子常在深棕色、有隔、多为膝状（之字形）的、直立的分生孢子梗上着生，分生孢子梗上的产孢细胞融合排布，细胞间的空隙形成微孔（“树状”产孢细胞）。分生孢子包括几个不同的部分，真正的隔膜见于孢子外壁和隔膜连续的分生孢子中，此为全壁隔膜（euseptate）分生孢子（链格孢属为全壁隔膜）。假隔膜是仅孢子壁内层参与分隔、而壁外层形成囊状结构包绕细胞，此为具离壁隔膜（distoseptate）的分生孢子（在双极霉属、弯孢霉属和明脐菌属中可见）[89-91]。

1. 链格孢属(*Alternaria*) 链格孢属仅有2个复合体种：浸染链格孢(*Alternaria infectoria*)和互格交链链格孢(*A. alternata*)，临床菌株多为这2个种，很容易鉴定。目前，可用的鉴定指标包括菌株的生长特性、孢子发生方式、形态学特点和ITS rDNA片段的巨大差异，后者可经测序或限制性片段长度多态分析展示[92]。浸染链格孢在组织中并无深色菌丝，而是透明的酵母细胞。与互格交链链格孢不同，浸染链格孢的菌落常为奶油样斑片物，孢子形成减少。浸染链格孢分生孢子的尖端有较长的喙，可作为次级分生孢子梗。互格交链链格孢的分生孢子呈链状排列[2,90]。偶有由细基格孢属(*Ulocladium*)引起暗色丝孢菌病的报道，但最近用多位点种系分析发现致病真菌实际上是链格孢属。与浸染链格孢和互格交互链格孢相比，细基格孢属的分生孢子梗膝状弯曲更明显，与产孢细胞直接相连的圆形分生孢子数量更多，分生孢子从一个狭窄的圆锥形基部产生[2,90,92-93]。

2. 离蠕孢属(*Bipolaris*) 澳大利亚离蠕孢(*Bipolaris australiensis*)、夏威夷离蠕孢(*B. hawaiiensis*)(图127-4)和长穗离蠕孢(*B. spicifera*)较常引起条件感染。它们的典型特征是分生孢子大而直，呈纺锤形或亚筒形，有明显的离壁隔膜，平坦的基部有深色瘢痕[2,89]。但最近发现，无论从形态还是种系上，这3种真菌都属于弯孢霉属的“*spicifera* 支”[91]。这些真菌与多种类型的暗色丝孢菌病有关，特别是侵袭性和非侵袭性的鼻窦炎[2,94]。米离蠕孢(*Bipolaris oryzae*)是狭义离蠕孢属的真正成员，可引起人类的角膜溃疡[95]。米离蠕孢的分生孢子较长、略弯曲，但不同于狭义的弯孢霉属，它的分生孢子缺少一个不对称肿胀的深色中间细胞[89,96]。

3. 弯孢霉属(*Curvularia*) 弯孢霉属常产生伸长的分生孢子，离壁隔膜不明显(年幼的分生孢子中可见内外层孢子壁，但在成熟的分生孢子中，这两层壁通常靠得太近，无法用光学显微镜分辨)，因带有一个不对称肿胀的深色中间细胞，使得分生孢子呈典型的弧状弯曲[89,96]。该属的模式种新月弯孢霉(*C. lunata*)(图127-4)和其他种都有此典型形态，例如，气生弯孢霉(*C. aeria*)、美洲弯孢霉(*C. americana*)、膝曲弯孢霉(*C. geniculata*)、人弯孢霉(*C. hominis*)、*C. muehlenbeckiae* 和塞内加尔弯孢霉(*C. senegalensis*)[89,91,96]。此前有报道描述了一些真菌，孢子有明显离壁隔膜但缺乏不对称肿胀中间细胞，它们在分类上也属于弯孢霉属[96]。弯孢霉属引起的临床感染类型多样，从表浅的皮肤感染、角膜溃疡、足菌肿，到侵袭性的暗色丝孢菌病[2,94]。

4. 明脐菌属(*Exserohilum*) 典型特征为分生孢子很长、有离壁隔膜，且基底部有突出的脐[89]。目前认为其中的3个种：长喙明脐菌(*Exserohilum longirostratum*)，麦金尼斯明脐菌(*E. mcginnisii*)和喙明脐菌(*E. rostratum*)(图127-4)能引起人和其他脊椎动物的条件感染[2,94]。这3种真菌的亲缘关系很近，需进一步研究确定它们之间的分类学差异[97]。相关的疾病包括鼻窦炎、角膜炎、眼内炎、腹膜炎、心内膜炎和其他深部的暗色丝孢菌病[2,94]。

5. 香港丝状菌属(*Hongkongmyces*) 最近，从一例皮下暗色丝孢菌病的患者中分离到一种不育的格孢腔目真菌，由此建立了香港丝状菌属。DNA序列分析数据显示，本属的模式种足癣香港丝状菌(*H. pedis*)属于格孢腔目的林德菌科(Lindgomycetaceae)，这个科的成员多为水生真菌，尚未发现其他对人致病的病原体[98]。

(十)粪壳菌目(Sordariales)

粪壳菌目是子囊菌纲的一个大目，具有广泛的多样性。足菌肿马杜拉霉(*Madurella mycetomatis*)最近被证明是粪壳菌目的一个新成员，属于毛壳菌科(Chaetomiaceae)[99]，将在第128章介绍。单孢瓶霉属(*Phialemonium*)，毛壳属(*Chaetomium*)和无毛毛壳菌属(*Achaetomium*)在第123章介绍。粪壳菌纲中 *Phialemoniopsis curvata* [以前的弯曲单胞瓶霉(*Phialemonium curvatum*)]的分类学位置未定[100]。

真菌的临床菌株产生浓重的黑色素，产黑色素细胞聚集成球茎状团块，因此，常被称为“丝葚霉属(*Papulaspora* spp.)”。培养过程中不产生有性期结构，可以出现瓶梗的无性期结构。分子研究表明，这些所谓“丝葚霉属”的真菌，是粪壳菌目中常引起条件感染的成员，与丝葚霉属的模式株 *P. sepedonioides* [黑孢壳菌(*melanosporales*)] 在种系上相距甚远[101]。

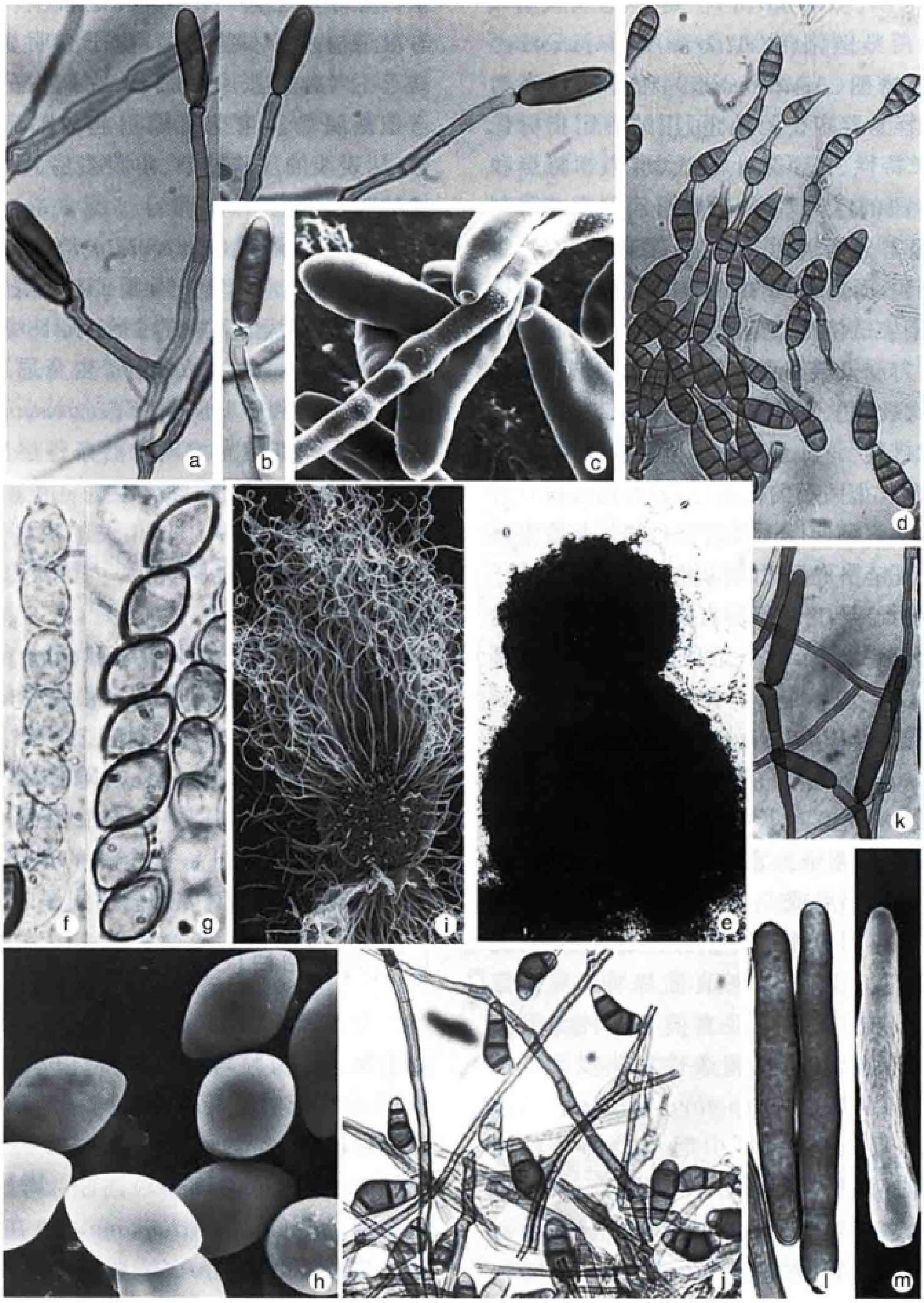


图 127-4 a～c. 夏威夷弯孢霉(*Curvularia hawaiiensis*);d. 互格交链链格孢(*Alternaria alternata*);e～h. *Achaetomium strumarium*;i. *Chaetomium globosum*;j. 新月弯孢霉(*Curvularia lunata*);k～m. 喙明脐菌(*Exserohilum rostratum*)。引自参考文献[2]

枝鼻菌属(*Cladorrhinum*) 无隔孢子从瓶梗侧方开口处中间的产孢细胞中生成,孢子呈黏液、团块状。本属真菌与传统上被看作是毛球壳科(Lasiosphaeriaceae)的有性型相关联[102]。枝鼻菌属包含约 8 个种[103],有文献报道 *C. bulbillosum* 在人类和马引起眼部感染[104-106]。*C. bulbillosum* 在 37～40 ℃快速生长[107]。这个真菌的显著特征是培养时耐热,能形成近球形或泪滴形的分生孢子、大量的微菌核及无致育性的刚毛状菌丝[104,107]。但也有一部分菌株在真菌培养基中仍保留致育性,其种属鉴定依赖于 DNA 序列分析[106-107]。

(十一)Togniniales 目

暗色枝顶孢属(*Phaeoacremonium*)　典型形态是菌丝体为疣状；瓶梗纤细、管状、常变细或膨胀，呈棕色。分生孢子透明、黏滑，从不显著的囊领着生。有性型的显著特征是子囊壳有长颈和侧丝(paraphyses)，八孢子囊中包含椭圆形或尿囊形的子囊孢子，拉丁学名曾为 *Togninia*。单一命名法摒弃了原来的名字，改称为暗色枝顶孢[108]。与人类疾病相关的有 11 个种(表 127-1)，其中寄生暗色枝顶孢(*Phaeoacremonium parasiticum*)(图 127-2)最常见。

(十二)黑星菌目(Venturiales)

赭霉属(*Ochroconis*)[和疣霉属(*Verruconis*)]　赭霉属是从 Sympoventuriaceae 分化而来的一个并系(paraphyletic)(指一组真菌，大部分从同一祖先繁殖而来)[109]。这一属中所有的种，菌落颜色可为深浅不一的铁锈色至橄榄色；分生孢子有 1～3 个隔膜，从数量较少的合轴细胞上开放的齿状嵌入结构上着生。广义赭霉属的成员偶可引起脊椎动物的暗色丝孢菌病，可为皮肤感染或肺、脑和其他脏器的深部感染[110]。广义赭霉属真菌的分子分类距离较大，嗜神经的种奔马赭霉(*O. gallopava*)(图 127-3)，分生孢子透明、棒状，有明显饰纹，40 ℃生长良好，因而被移入一个单独的属，即疣霉属；而本属其他嗜温真菌仍被保留在赭霉中[109]。

二、流行病学和传播

(一)暗色丝孢菌病

暗色丝孢菌病常为皮下组织感染，也可为播散性或累及中枢神经系统的感染[111]。暗色真菌也可引起诸如皮肤和指甲的表浅感染[28, 67, 112]。中枢神经系统感染往往为致死性的脑脓肿或脑膜炎，感染者的脑脊液中可检出真菌。感染者多为免疫功能正常的人。典型症状包括头痛、神经功能缺陷和抽搐。常见的嗜神经种为斑替枝孢瓶霉、麦肯兹枝绿霉、奔马疣霉和皮炎外瓶霉。真菌可从肺内原发感染灶播散至中枢神经系统，也可经皮肤或皮下感染直接播散[43-44, 113]。暗色丝孢菌病的常见病原体为毒物外瓶霉、甄氏外瓶霉、皮炎外瓶霉、棘状外瓶霉、斑替枝孢瓶霉和弯孢霉。浅表皮肤感染的病原真菌主要是链格孢、双间新柱顶孢霉和酵母样真菌如寡育外瓶霉、欧洲杯梗孢和威尼克何德霉[31, 112-114]。

皮肤(下)和角膜感染的途径大多为创伤植入，真菌含色素的菌丝或酵母样成分诱发感染组织形成反应性炎症[111]。而掌黑癣的感染途径与此不同，其病原体威尼克何德霉偏向于在皮肤角质层定植，此部位的湿度、pH、含盐量等因素与威尼克何德霉的自然生境极为类似[2, 19]。着色芽生菌病则导致皮肤的过度增生，感染组织中含侵袭相的砖格状细胞。在次盾臭目的黑酵母样真菌引起的暗色丝孢菌病或着色芽生菌病中，不同真菌所引起的病变过程大多因种而异，但某些真菌如广义的疣状瓶霉却可同时引起炎症和增生 2 种类型的病损[49, 115]。皮下感染的真菌在环境中不常见，尚不明确它们的自然生长环境。某些耐热的种似乎与环境中的外来物质有关、或存在于动物粪便中[40, 116]；还有一些真菌可在渗透压较小的物体表面检出，如水果表面[4]。在湖泊、海水、城市饮用水、医院用水和河床沉积物中，常可发现对冷血脊椎动物致病的嗜冷真菌[21, 117-119]。而在蒸气浴[120]和洗碗机[121]等室内环境中发现有外瓶霉的存在。格孢腔目的成员，例如链格孢属、离蠕孢属、弯孢霉属和明脐菌属对多种植物致病，存在于腐烂的植物和土壤中[89-90]。这些真菌可引起人和牛的过敏性或侵袭性鼻窦炎，或甲真菌病、角膜真菌病等其他感染[2, 91-92, 94-95, 97, 114]。座囊菌目的许多成员可耐受极限的生长条件，甚至出现在南极和地中海的石头[122]或超盐池塘中[65]。这些真菌在形态上能转变为一种有耐受力的、以分生组织形式存在的生态型(ecotype)，其内部含有由厚壁、高度黑化的细胞聚合成的无定形团块，团块可崩解为更小的碎片。本章中的葡萄座腔菌目、间座壳目和 Togniniales 目多数为植物病原菌[12, 57, 108]；而小囊菌目、粪壳菌目和黑星菌目大多被看做是分解富纤维素基质的土源性腐生菌和内生菌[70-73, 75, 101-107, 109-110]。

(二)着色芽生菌病

着色芽生菌病是最常见的一种皮下真菌病，热带和亚热带地区多发，主要感染从事农业相关工作的成年男性。发病的性别差异，推测可能与

人的性激素分泌有关，但病原真菌的职业暴露也是一个重要原因[123-124]。真菌常从被荆棘或碎片刺破的皮肤伤口处感染。病原真菌常存在于腐烂植物和土壤中。一些报道认为这些致病性真菌可能存在于棕榈树和旱生植物中，但最近的测序数据证明，这些感染多与其他类型的专性腐生真菌相关[30,46]。例如，在委内瑞拉的干旱地区，仙人掌的刺携带叶格斯枝孢瓶霉（*Cladophialophora yegresii*），而人的感染由卡氏枝孢瓶霉引起。叶格斯枝孢瓶霉在植物刺中产生的砖格状细胞，形态上类似于卡氏枝孢瓶霉在着色芽生菌病中产生的砖格状细胞。因此，这些细胞被认为是真菌的一种高度耐受的存活形式，很可能在其自然生活史中发挥必不可少的作用[30]。引起着色芽生菌病的真菌病原体还不甚明确。在热带的常绿森林中可分离到着色霉属，而卡氏枝孢瓶霉仅见于气候干旱的沙漠中[115,124]。

(三)孢子丝菌病

致病性孢子丝菌存在于土壤和带刺的植物中，经创伤感染人。原发性肺孢子丝菌病常为吸入性感染，感染者多有酗酒史[125]。巴西孢子丝菌有特定的感染方式，即人通过流浪猫的抓咬而感染，因此，流浪猫被认为是这种真菌的主要宿主[85]。感染可发生在不同人群中，例如，园丁、城市工人、犰狳猎捕者和一些接触家猫的人。巴西曾发生一次巴西孢子丝菌的大规模流行[85]。美国报道了几起与职业或娱乐接触水藓有关的孢子丝菌病的暴发；最大规模的一次暴发是在 1988 年，累及 84 例患者[82]。尽管大部分孢子丝菌的感染发生在健康人群，但现在认为该菌也可在免疫低下人群中造成条件性感染[126]。

三、临床意义

本章涉及的真菌性疾病主要为发生在健康宿主中的局部感染。感染多由环境中污染的真菌经创伤接种引起；偶有真菌在鼻窦炎、中耳炎或囊性纤维化患者的肺部黏液中生长，此时可见不典型的或轻症的空腔定植。本章中多数真菌是典型的条件致病菌，在固有免疫缺陷或患代谢疾病的人群如糖尿病患者中，引起的感染加重。这部分患者可能同时伴有一些黑酵母引起的轻症皮肤感染[119]，这些黑酵母大多是冷血动物体内所特有[127-129]。严重免疫紊乱患者的感染多与赛多孢霉属相关，例如，中性粒细胞减少症、实体器官移植或长期接受皮质类固醇治疗的患者[70]。次盾臭目的一些种（如班替枝孢瓶霉和麦肯兹喙枝孢）能引起无明显免疫缺陷宿主深部脏器组织的感染或播散性感染。若不经治疗，经历破坏性进展后，疾病会演变为慢性致命性的过程[130]。尽管这种感染的发生率较低，但考虑到这类疾病引起的严重后果，且病原性真菌有时对抗真菌药高度耐药，临床上必须加以高度重视。着色芽生菌病在亚热带乡村显著多发[115]。获得性细胞免疫缺陷如 AIDS 患者中，孢子丝菌感染的严重程度会增加[82,126]。

下列是暗色真菌引起的一些特殊的疾病表现。

(一)暗色丝孢菌病

1. 皮肤浅表的感染

(1)葡萄座腔菌目：双间新柱顶孢是热带地区一种常见的植物病原体，一般引起皮肤和指甲类似皮肤癣菌感染的症状，常导致角化过度[112]。

(2)煤炱目：嗜盐种威尼克何德霉能黏附于人的皮肤表面，尤其是手掌和脚掌上。真菌在皮肤表面生长，形成色素沉着和皮疹，造成角蛋白层死亡，导致熟知的掌黑癣[2,19]。

(3)次盾臭目：次盾臭目的部分真菌有时引起人体皮肤浅表感染。*Cladophialophora boppii* 可引起甲真菌病[128]。有时能从人的皮肤和指甲中分离出条裂杯梗孢和多隔杯梗孢[31]，但它们的致病性尚未明确。欧洲杯梗孢和多种外瓶霉能引起皮肤和指甲的感染，但因其生长缓慢，临床检测中常被漏检[31,127-129]。

(4)座囊菌目：最近报道了 1 例罕见的健康人面部掌黑癣样的感染，由产黑色素短梗霉所致[67]。

(5)小囊菌目：从外观正常的人类皮肤和指甲中常能分离到帚霉属的真菌。但是，本目中诸如 *S. brevicaulis* 在内的条件致病性真菌可导致角化组织的感染[2,71]。从眼睑的湿疹样鳞屑病损中发现了 *T. pulvinata*[75]，目前仅在沙特阿拉伯发现这种真菌的感染。

(6)长喙壳菌目：最近描述的智利孢子丝菌是一种可感染人类指甲的土源性真菌[88]。

(7)格孢腔目:偶有互格交链链格孢和弯孢霉属引起的条件性甲真菌病的报道,这类感染的患者常有污染泥土的指甲外伤史或免疫抑制的情况[114,131]。

2. 皮肤和角膜的感染

(1)葡萄座腔菌目:柯柯豆毛色二孢有时会引起受伤角膜的眼部感染[8]。有报道称外伤后角膜炎也可由菜豆壳球孢[132]和双间柱新顶孢[133]引起,但到底为哪种致病因子需进一步研究证实。Srinivasan 等[11]报道了1例由菜豆壳球孢引起的儿童急性髓性白血病的皮肤感染病例。

(2)煤炱目:枝孢霉属如枝孢样枝孢霉和尖孢枝孢霉与室内环境中的过敏性疾病、多种皮肤和皮下真菌感染与深部感染有关,但其在致病中的作用仍有待证实[2]。考虑到枝孢霉是实验室极常见的污染菌,应该用原位杂交或免疫组化进一步证实可能的感染。

(3)次盾炱目:*Cladophialophora emmonsii*、*Cladophialophora boppii* 和土星形枝孢瓶霉(*Cladophialophora saturnica*)偶可引起轻度皮肤感染[2,27-28];外瓶霉属的几个种,例如,毒物外瓶霉、寡育外瓶霉和伯杰外瓶霉,也可引起程度不同的皮肤感染[40,53,113,129]。目前,表皮努夫菌仅发现于人类皮肤上,可为无症状的皮肤定植,或与皮肤霉菌感染有关,也可引起轻型皮肤感染。表皮努夫菌引起的感染症状类似于掌黑癣,但掌黑癣的病变仅累及角质层,而表皮努夫菌可侵犯皮肤下层甚至到达真皮基底层[47]。外瓶霉的一些种,例如皮炎外瓶霉和甄氏外瓶霉,偶可引起外伤或术后角膜炎[134-135]。

(4)间座壳目:有报道在1例翼状胬肉术后的巩膜角膜炎中发现 *D. phoenicicola*[58]。*D. longicolla* 和 *D. phaseolorum* 可引起器官移植患者术后皮肤感染[59,61]。

(5)长喙壳目:在1例角膜移植术后的角膜炎中,病原体是一种常分离自土壤的苍白孢子丝菌(*S. pallida*)[87]。

(6)格孢腔目:格孢腔目感染最显著的一个临床特征,是链格孢主要在长期使用类固醇、他克莫司或其他免疫抑制剂的患者中导致皮肤感染。几乎所有感染的病原体都是这个属的2个主要腐生种——浸染链格孢和互格交链链格孢[92]。报道中由厚垣链格孢(*A. chlamydospora*)引起的感染很可能是组织分生的互格交链链格孢引起[114]。几种皮肤感染已经归因于极细链格孢(*A. tenuissima*),但能否与互格交链链格孢相区分,这一点还需明确[92]。喙明脐菌和弯孢霉属中的新月弯孢霉、长穗弯孢霉和塞内加尔弯孢霉,偶可引起皮肤和角膜的感染[91,94,136]。有报道显示米离蠕孢也引起角膜炎[95]。

(7)粪壳菌目:*C. bulbillosum* 是真菌性角膜炎的病原体,Zapater、Scattini[104]和 Gajjar[105]等报道了人类的感染,还有1例是 Chopin 等报道的马的感染[106]。在目前报道的这3个病例中,2例是在局部外伤后获得的。一些报道认为马丝葚霉是马和人角膜感染的病原体[137-138]。将马丝葚霉和 *C. bulbillosum* 这2个模式种的序列,分别为 CBS573.89(GenBank 序列号:JX280870)和 CBS304.90(GenBank 序列号:FM955448)进行 BLAST 比对后,发现它们的 ITS 序列相似性竟达到99%。此结果提示这2株真菌很可能就是同一个种。我们将进一步研究这2个真菌名下所有菌株的形态特征,并增加测序的位点,以证明这个假设。如果确实属于同一真菌,就应使用 *C. bulbillosum* 这个名字,因马丝葚霉与丝葚霉属的模式种 *P. sepedonioides* 的种系关系甚远[101]。马丝葚霉较大可能是 *C. bulbillosum* 在培养基中不产生瓶梗、只形成微菌核的形式。最近发现,从人角膜感染中分离到的丝葚霉属的其他株在分类上属于子囊菌纲的 *Subramaniula* 属[101]。

3. 皮下感染

(1)葡萄座腔菌目:由柯柯豆毛色二孢[7]和双间新柱顶孢[139]引起的皮下感染的报道很少。有案例报道称壳球孢属真菌引起猫的毛皮下肉芽肿,但该报道描述得过于简略,从文章的图片中也无法判断所感染真菌的类型[140]。

(2)美球菌目:*Pleurostomoa richardsiae* 引起的人类感染大多为皮下囊肿,有时累及骨组织。多数患者有基础疾患,例如,糖尿病或器官移植[141]。有1例由 *P. ochracea* 引起黄色颗粒足菌肿的报道[15]。

(3)次盾炱目:已发现,与人类皮下感染有关的外瓶霉属的真菌有10余种[4,38-39,113,119]。皮炎外瓶霉是临床最常见的外瓶霉属致病真菌,在大多数免疫功能不全的患者中引起皮肤和皮下组织的感染[142]。寡育外瓶霉常引起免疫抑制、年长、糖

尿病或过劳人群的皮下组织感染[143]。甄氏外瓶霉主要与皮下感染有关，是健康人群足菌肿的主要致病菌[40,144]。次盾臭目中导致足菌肿的病原真菌还有班替枝孢瓶霉和足菌肿枝孢瓶霉[27]。一些不太常见的次盾臭目成员也能引起脊椎动物皮下暗色丝孢菌病，包括德夫利枝孢瓶霉（*Cladophialophora devriesii*）、*C. immunda*[2,27]、*Cyphellophora suttonii*[34]和 *Veronaea botryosa*[56]。报道中显示的1例由 *Anthopsis deltoidea* 引起的鹰嘴滑囊炎[23]，其真正的病原体很可能是目前尚未描述的花霉属真菌[24]。

(4)间座壳目：*D. bougainvilleicola* 可引起肾移植患者的髌前滑囊炎[60]，间座壳属真菌导致合并糖尿病的类风湿关节炎患者在接受强的松治疗时发生的手指脓肿和骨髓炎[62]。另有1例由 *Diaporthe phaseolorum* 引起的黄色颗粒足菌肿的报道[64]。

(5)小囊菌目：在以北美为代表的温带地区，赛多孢霉属的几个种是皮下组织感染和足菌肿的常见原因，感染好发于关节[145]。多育节荚孢霉和帚霉属的真菌与多种临床表现有关，包括皮下感染[2,70,72-73]。最近发现 *Knoxdaviesia dimorphospora* 可引起鹰嘴滑囊炎[69]。

(6)格孢腔目：格孢腔目的成员常引起健康人过敏性鼻炎、感染偶累及脑部，它们也能引起皮下感染（最常见的是弯孢霉属、明脐菌属和链格孢）[2,94,114]。最近的报道描述了一种不育真菌——足癣香港丝状菌（*Hongkongmyces pedis*）在免疫失调患者中引发的足部皮下感染[98]。

(7)Togniniales 目：本目真菌是皮下感染的典型病原体。在致病的11个种中，暗色枝顶孢属引起的感染最典型，包括足菌肿和多种浅表及侵袭性暗色丝孢菌病。暗色枝顶孢属还包括多种重要的植物病原菌[108]。

(8)黑星菌目：嗜神经的奔马赭霉（现更名为奔马疣霉）是赭霉属中最为熟知的成员。在本属中的另一个成员，奇异赭霉（*O. mirabilis*），能引起人和脊椎动物皮肤和皮下感染[110,146]。

4. 系统性感染

(1)葡萄座腔菌目：柯柯豆毛色二孢引起肺炎的报道有一例[147]。双间新柱顶孢可引起免疫功能低下患者的深部感染[139,148]。

(2)次盾臭目：次盾臭目引起的疾病主要限于免疫低下或免疫正常患者中的原发性脑部感染，即脑炎，感染者首发症状常为神经系统的异常。在大脑实质的脓肿中可直接或经 Fontana-Masson 染色观察到深色菌丝。真菌可经肺侵入机体，但患者的症状常局限于脑部。多数非创伤性脑感染由次盾臭目的5个种引起。由斑替枝孢瓶霉引起的感染中，1/3发生于健康人群[130]，未经治疗的感染者在1～6个月内死亡。皮炎外瓶霉在健康年轻人中引发的神经系统感染死亡率极高，病例全部来自亚洲[130,142-143]。引起系统感染的次盾臭目还包括谦逊枝孢瓶霉（*Cladophialophora modesta*）、单孢着色霉和麦肯兹喙枝孢3种。其中麦肯兹喙枝孢倍受关注，它仅在中东地区或来自中东地区的移民中引起致死性的脑部感染[2,130]。麦肯兹喙枝孢在环境中的分布情况仍然未知，受累人群大多并无已知的免疫系统紊乱。偶可发现有或无明显诱因导致感染扩散的患者，若不及时治疗，容易引致死亡。暴发性的继发皮损往往见于德夫利枝孢瓶霉、谦逊枝孢瓶霉、精灵枝孢瓶霉（*C. arxii*）、皮炎外瓶霉和棘状外瓶霉导致的感染[2,130,142,149-150]。后2个种对人有很强的毒力，感染组织中酵母样细胞外有荚膜多糖样的细胞外物质[151]。棘状外瓶霉引起的感染罕见，可为局限性，一半左右发生在青少年，表现为致死性的播散性感染（de Hoog 等[152]的综述）。皮炎外瓶霉和暗色砖格外瓶霉是囊性纤维化患者常见的肺部定植真菌，前者多于后者[153]。亚洲外瓶霉见于1例免疫功能正常人的播散性感染[154]。

着色霉属中的单孢着色霉引起包括颅内感染在内的多种临床表现[42,130]。因此，在某些原先被报道为裴氏着色霉感染的暗色丝孢菌病中，应进一步重新确定其致病真菌是否应为单孢着色霉。疣状瓶霉偶可引起心内膜炎和骨髓炎等条件性感染[155-156]，后来发现有些感染的病原真菌实际上可能是瓶霉属的其他成员。在1例免疫缺陷患者发现了由关节枝孢霉引起的致死性播散性感染[25]，也有1例由该菌在健康人引起的关节炎和骨髓炎的报道[26]。

(3)座囊菌目：出芽短梗霉可能是导管相关性脓毒症、腹膜炎和播散性感染的病原体[2,66,157]。*Hormonema dematioides* 在皮肤病损、真菌血症和腹膜炎中出现[2,158]。

(4)小囊菌目：由赛多孢霉属引起的深部感

染和播散性感染较常见于免疫缺陷或极度衰弱的患者。在赛多孢霉感染的报道中，相关临床疾病谱的描述一直不固定，1911－1980年的报道中，以健康人的慢性足菌肿多见，1980年之后，则以全身的条件性感染为主[145,159]。常见实体器官移植后的全身感染、骨髓炎和关节炎[145,159]。Fisher等[160]首次描述尖端赛多孢与溺水综合征有关，此病的特征是患者误吸污染水后发生迟发性、致死性的脑部感染。严重免疫功能缺陷的患者，局部感染后可引发脑部播散性感染。赛多孢霉属在囊性纤维化患者中分离率很高，但多数成员仅为定植菌[145,159]。

多育节荚孢霉是小囊菌目中毒力最强的一个种，临床感染发生率较高，但其发现历史并不长[70]。1984年Malloch和Salkin[161]描述了第一个临床病例。之后在很多以免疫功能低下为主的患者中发现了多育节荚孢霉的菌株。因此前并无免疫正常人群中感染的报道，故认为多育节荚孢霉引起的感染是一种新发的条件性感染[162]。该真菌引起骨和软组织感染、皮肤感染（继发）、真菌血症和心内膜炎[2,145,159]。在免疫力低下患者中感染可播散至内脏。曾有医院内暴发感染的报道[163]。

Triadelphia disseminata 在急性髓系白血病患者导致致死性播散感染。血培养可分离到真菌，临床表现和影像学检查提示肺和脑部受累[5,76]。

（5）长喙壳目：云杉长喙霉曾导致急性淋巴细胞白血病患者的侵袭性、致死性的肺和脑部感染。这个真菌在感染组织和培养基中都形成伸长的酵母样结构和有隔菌丝。菌落在初期几乎无色，随时间延长颜色逐渐加深。显微镜下缺乏孢子丝菌样的合轴分生孢子[79]。

（6）格孢腔目：弯孢霉属可引起多种侵袭性条件性感染，包括心内膜炎、肺感染、脑感染和腹膜炎[91,96,164-165]。因注射被污染的甲泼尼龙制剂，喙明脐菌引起过一次较大规模的医源性暴发，很多患者死于脑膜炎和中枢神经系统血管炎[166]。

（7）Togniniales目：寄生暗色枝顶孢能导致体弱患者的深部或播散性感染[108,167]。

（8）黑星菌目：奔马疣霉能引起免疫功能正常和免疫低下个体的肺感染或侵袭性感染，也是火鸡和鸡群动物脑炎的病原体之一[109-111]。

(二)着色芽生菌病

着色芽生菌病在健康人群中也可发生；以慢性皮肤或皮下损害为特征，常有明显的增生病变。首发病损表现为真菌侵入部位的丘疹，丘疹逐渐扩大后形成斑块样或瘤样（菜花样）病变，真菌能通过淋巴系统扩散，也有血行播散。引发的病损包括形成有一定耐受力的球形砖格体（硬壳小体），大多数有十字隔膜，这是着色芽生菌病的典型病理改变[115]。

实际上几乎所有着色芽生菌病都由次盾臭目的3个种引起，即卡氏枝孢瓶霉、裴氏着色霉和疣状瓶霉。卡氏枝孢瓶霉的感染主要发生在气候干燥的条件下，可通过仙人掌的刺创伤接种而感染[115]。*Cladophialophora boppii* 偶可引起着色芽生菌病[168]，最近描述的新种萨摩亚枝孢瓶霉（*Cladophialophora samoënsis*）、*Cyphellophora ludoviensis* 和热带喙枝孢也可引起此病[27,36]。疣状瓶霉引起的感染主要发生在热带地区[169]。播水喙枝孢是拉丁美洲着色芽生菌病一种少见的病原体[54]。着色芽生菌病的系统性感染非常罕见；最近有1例由 *Fonsecaea pugnacius* 引发的、进展数十年的患者，在右臂和面部发生疣状病损，病灶含典型的砖格样小体。感染后来播散到脑部时，真菌进入到暗色丝孢菌病的发育阶段[44]。

(三)孢子丝菌病

孢子丝菌病是可经淋巴扩散的皮肤或皮下的慢性感染。鼻和肺部的感染是由于吸入孢子丝菌的分生孢子所致，感染很少累及肌肉、骨骼或全身播散[82,125]。多数感染来源于真菌在创伤部位的植入。AIDS患者中可见孢子丝菌的播散感染[126]。另外，有报道指出感染也可经动物传播[85,170]。

四、标本的采集、运输和储存

标本的采集、运输和储存方法在第117章中有所阐述。恰当的标本取材对进一步真菌学检查很有必要。直接显微镜检查和分离培养也需要足量的标本。

五、直接检测

(一)显微镜检查

暗色孢类真菌的细胞壁中有二氢萘黑色素的沉积，导致其营养细胞或分生孢子具有较深的色泽，菌落颜色呈橄榄色、灰色或黑色。很多真菌都有产生深色色素的特点，但真菌在宿主的感染组织中表达的黑色素量可能很低，传统的组化染色难以观察。目前，常规使用 Fontana-Masson 染色法(第 118 章)，能鉴别菌丝中的黑色素，可将产黑色素的真菌与“透明丝孢菌病”的病原真菌如镰刀菌区分开来。本法不适于孢子丝菌和赛多孢霉属的鉴定，因两者在体内或体外培养时虽然能产生深色的分生孢子，但它们并不属于暗色孢类真菌。孢子丝菌在组织中为典型的“雪茄形”酵母样真菌，而赛多孢霉属的鉴定需依赖组织病理学以外的其他方法。

为提高真菌检出率，可用多种方法处理和检查标本，包括使用氢氧化钾和荧光增白剂处理，进行 Giemsa、Wright 或革兰染色(第 118 章)。使用过碘酸-雪夫染色(periodic acid-Schiff，PAS)、苏木素伊红染色或六胺银染色的组织病理学染色法，可从形态学上提高真菌的检出率。Fontana-Masson 染色利于在光镜下观察透明菌丝细胞中的色素[171]。以下为不同感染标本检查特点的总结。

1. 皮肤感染 皮肤感染组织中可见有色菌丝，或色泽较深的酵母样细胞(图 127-5)。

2. 鼻窦炎 患者的鼻窦常被无定形的真菌球堵塞。组织学检查见大量有色的、分枝状有隔菌丝，除了免疫抑制的患者外，真菌不常侵入鼻窦黏膜层。

3. 脑部感染 感染组织中的菌丝多无色并缺少分枝。随疾病进展可有脓肿形成(图 127-5)。

4. 播散性感染 感染中可见菌丝或类酵母细胞的真菌成分，有色或基本无色(图 127-6)。

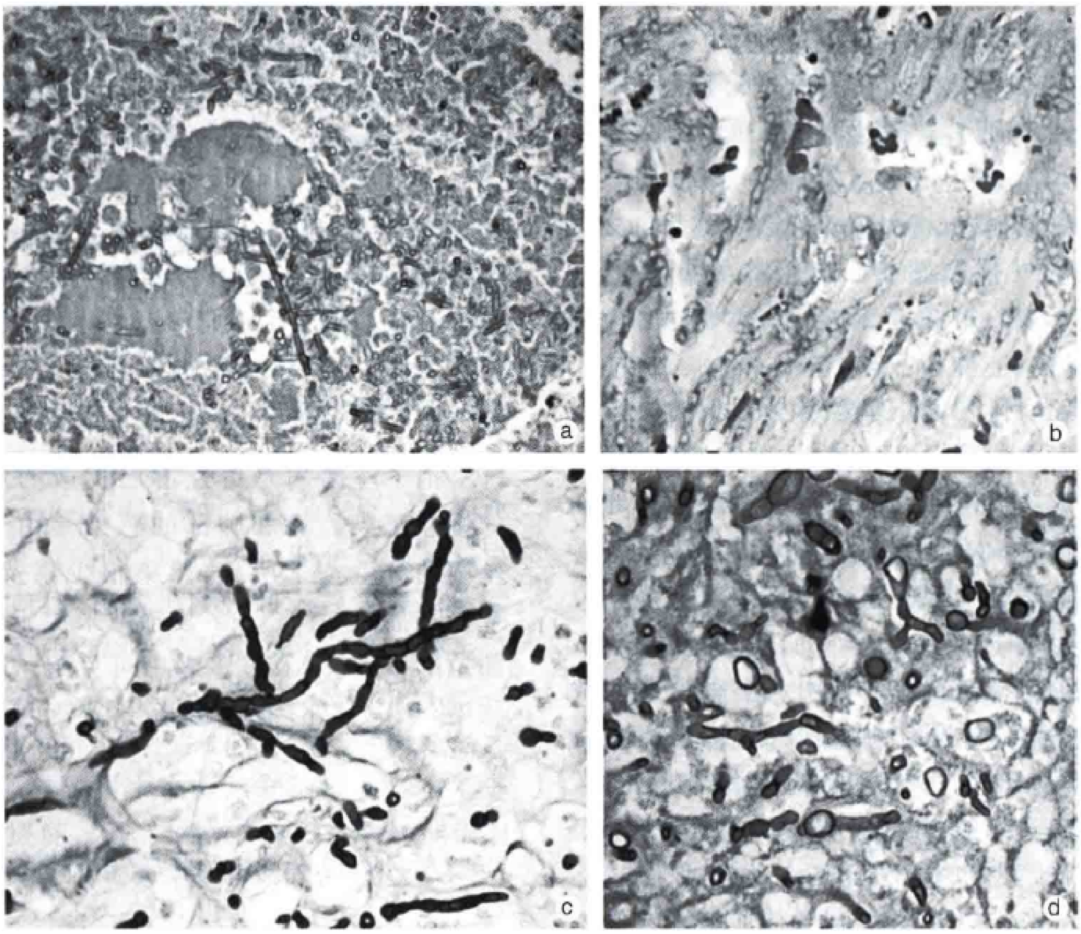


图 127-5 a. 皮下结节活检样本的苏木素伊红染色，可见单孢着色霉(*Fonseacea monophora*)的分枝菌丝；b～d. 班替枝孢瓶霉(*Cladophialophora bantiana*)在脑组织中不规则的有隔分枝菌丝，苏木素伊红染色(b)，GMS 染色(c)，PAS 染色(d)。放大倍数：(a)×250；(b～d)×400(Rovira i Virgili 大学 E. Mayayo 惠赠)，见彩插

5. 着色芽生菌病　此类感染的标志是在组织切片或脓肿、刮取物和活检样本中出现砖墙样细胞或硬壳小体。砖墙样细胞是肿胀、球形、深棕色的厚壁细胞，厚壁细胞常形成隔膜，并最终由不止一个平面上的隔膜交叉分隔(图 127-6)。

6. 孢子丝菌病　孢子丝菌病中偶见透明的酵母样细胞，在其狭小的基部可有细小的子细胞。通常这些细胞数量较少，显微镜下易被漏掉，推荐使用 Gomori 六胺银染色或 PAS 染色观察；Fontana-Masson 染色阴性(图 127-6)。

(二)抗原和核酸检测

本章中涉及的临床标本真菌抗原或核酸检测的诊断内容较少。血浆或无菌体液中存在的真菌细胞壁成分——(1,3)-β-D 葡聚糖(BG)，是侵袭性真菌感染的有效标志物，BG 的检测在辅助诊断念珠菌病和曲霉菌病中的意义也得到认可。但应注意，由诸如链格孢属、枝孢霉属和赛多孢霉属等少见的病原性真菌引起的侵袭性感染中，血清 BG 也可呈阳性[172]。在美国的一次与注射用类固醇污染有关的医源性真菌脑膜炎中，BG 的检测显示了对诊断喙明脐菌感染的高敏感性和特异性[173]。这项研究中，BG 水平与临床进展相关，这为患者临床处置方案的制定提供了非常有益的参考数据。

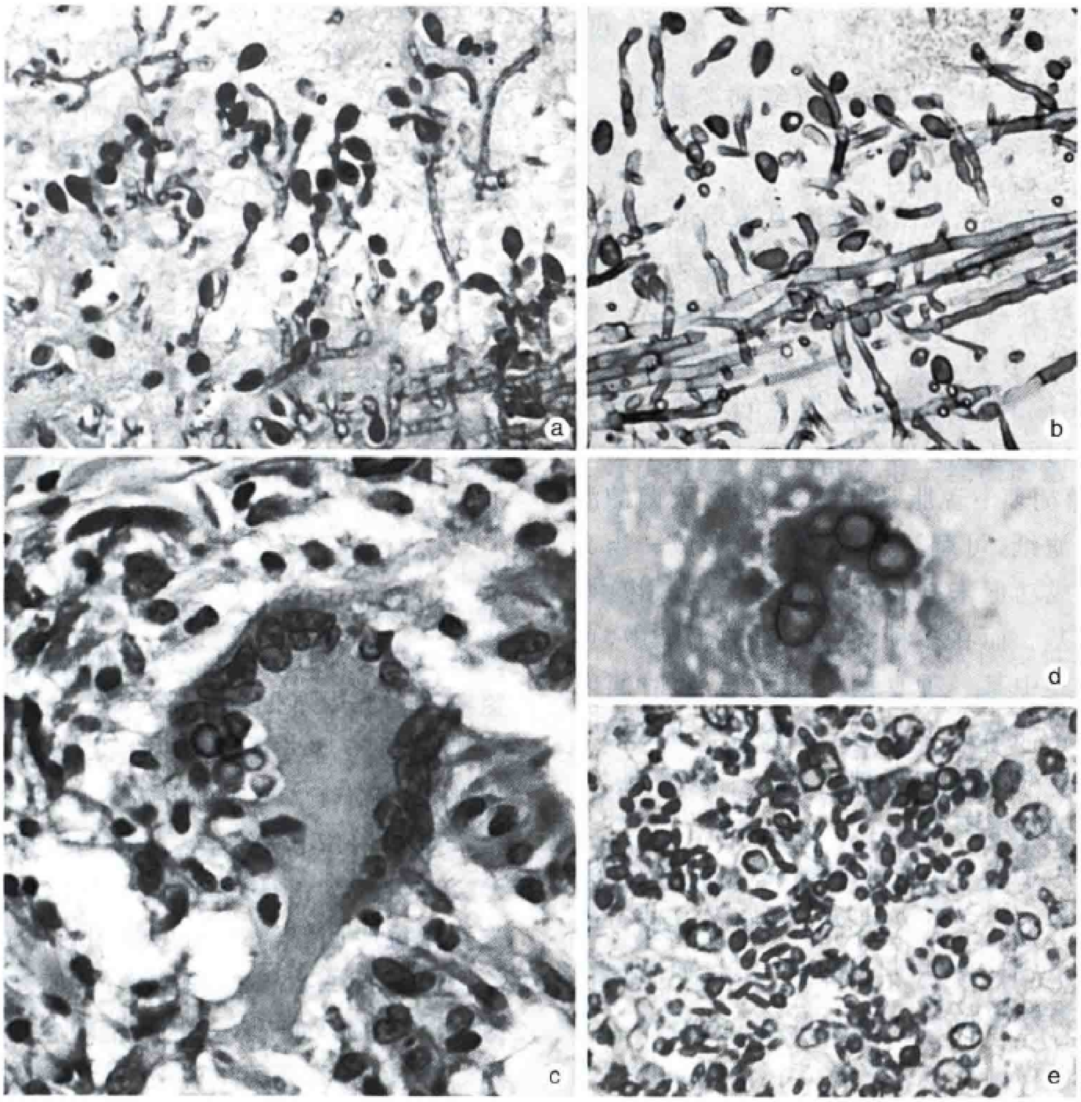


图 127-6　a 和 b. 含有大量多育节荚孢霉(*Lomentospora prolificans*)的菌丝和孢子的肺组织，a 为 PAS 染色，b 为 GMS 染色；c. 皮下结节活检的 PAS 染色，示多核巨细胞中的裴氏着色霉硬壳小体；d. 皮下结节细针穿刺样本的 PAS 染色，示裴氏着色霉硬壳小体；e. 肝血管腔中大量申克孢子丝菌栓塞，可见典型的伸长细胞。放大倍数，×400 (Universitat Rovira i Virgili E. Mayayo 惠赠照片)，见彩插

非特异性真菌 PCR 针对的是 rDNA 基因簇的 ITS1 区，可用来检测新鲜组织或石蜡包埋组织中的真菌 DNA。本法对于鉴定赛多孢霉属、外瓶霉属和明脐菌属有效。PCR 产物测序后可与 GenBank 数据库的序列比对[174]。针对美国最近因污染的甾类药物注射而暴发的喙明脐菌感染，报道了多种快速的分子检测法。Gade 等[175]建立了一个能检测人类体液中游离循环真菌 DNA 的方法，并可进一步以真菌通用引物和明脐菌属特异性引物扩增 ITS2 区，进行测序。这种检测方法的特异性比培养法更高。在喙明脐菌感染中，目前已建立了高度敏感的特异性实时定量 PCR 技术，用于快速定量检测脑膜炎患者脑脊液或脑组织中的真菌[176]。

六、分离程序

临床相关的暗色真菌在普通真菌培养基如沙氏葡萄糖培养基上生长良好，这些培养基可满足真菌的分离培养需求。但沙氏培养基中富含一些简单营养成分，有利于营养菌丝而非生殖菌丝的形成，因此不能有效诱导真菌孢子的形成。贫营养培养基有利于真菌形成有性结构，例如，玉米粉琼脂、马铃薯胡萝卜琼脂、2％的水琼脂、灭菌的湿润棉签或湿滤纸，可刺激分生孢子的形成。当真菌分离培养成功但未获得孢子时，推荐选用这些贫营养培养基。而在多种病原参与的感染中，可能在培养时其中某一种真菌生长受限，短时间内分离不到。这种情况下，取一接种环的细胞悬于0.1％吐温中，将其划线接种于另一平板表面，可分离出单个菌落用于鉴定。

推荐使用含或不含放线菌酮的培养基进行真菌的初代培养。许多重要的病原性暗色真菌对放线菌酮耐受，包括次盾臭目和长喙壳目，而其他种类的真菌则多数敏感[2,71,79]。

七、鉴定

本章中大部分真菌经典的鉴定方法，是将真菌培养后观察上文描述的各形态学特征，多可鉴定到属。第 118 章描述了相关的培养基。马铃薯葡萄糖琼脂或玉米粉葡萄糖琼脂载玻片培养法，利于观察真菌分生孢子的形成过程，但这一检查必须在生物安全柜中操作。本章各真菌的形态学特点，参见 de Hoog 等[2]的论文。

目前，大多数真菌的分子鉴定是通过核糖体基因的序列分析和与专用数据库的比对完成的[177]。这类数据库的代表有：① www.westerdijkinstitute.nl；② http://its.mycologylab.org/。两者分别由荷兰乌得勒支的韦斯特迪克真菌生物多样性研究所（Westerdijk Fungal Biodiversity Institute）和国际人类动物真菌学会（the International Society for Human and Animal Mycology）建立。鉴定少见真菌时，应谨慎使用 GenBank 数据库，因其中至少 10％的序列可能有误[92]。我们不仅要从技术的角度来分析测序结果，还要从命名学的角度来考虑，例如，与以前分类中所属的菌株进行比较。

如果将核糖体基因作为分类依据，可通过核 SSU（18S 亚基）或部分大亚基（28S）rRNA 基因的测序来鉴定真菌在分类系统树上的位置。这些基因在近缘的真菌中很少变异。多数真菌可通过 ITS 序列分析鉴定到属，但是否将其作为暗色真菌分类的金标准仍存在争议。例如，在链格孢的一些属中，很多种真菌形态上差异明显，但它们的 ITS 区基本相同。因此，有必要明确 ITS 在反映真菌多态性上是否存在不足，或某一属中是否划分了过多的种[93]。而基于 ITS 的分类方法用于黑色酵母的鉴定非常有效[21,129,152]。对于孢子丝菌等一些属，测序真菌的钙调蛋白基因，可有效地鉴定复合群中不同的种[81,83-84]。β-微管蛋白基因测序可用于鉴定赛多孢霉属[72,73]和暗色枝顶孢[167]。基于 DNA 序列分析的真菌鉴定方法的现状，可参考 Hibbet 等学者发表的综述[178]。

近年来，一些研究评估了基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱（matrix-assisted laser desorption ionization-time-of-flight mass spectrometry，MALDI-TOF MS）对丝状真菌的鉴定效果。研究主要涵盖透明真菌的鉴定，最近 Sanguinetti 和 Posteraro[179]对这部分内容进行了综述，总的鉴定正确率为 72％～98.8％。MALDI-TOF MS 对少数几种暗色真菌的鉴定取得了满意效果，例如，外瓶霉属[180-182]、节荚孢霉属和赛多孢霉属[183]；但这项技术有时不能区分近缘的种，例如皮炎外瓶霉和暗色格砖外瓶霉[181]。此外，对于暗色真菌，质

谱鉴定中所使用的商业平台尚未提供反映真菌多样性的参考数据库。最近 Singh 等[184]的研究评估了 MALDI-TOF MS 在临床相关暗色真菌鉴定中的应用效果。该研究收集了印度 19 个医疗中心 4 年里分离的真菌，DNA 序列分析鉴定到 29 种暗色真菌，而利用（德国不来梅）布鲁克·道尔顿的商业数据库经 MALDI-TOF MS 鉴定成功的真菌只有其中的 6 种（20%），使用一个内部数据库能鉴定出其余的 20 种。正如 Sanguinetti 和 Posteraro[179]所指出的那样，亟需建立一个全面的在线数据库，以广泛应用 MALDI-TOF 对丝状真菌进行鉴定。

八、分型

近年来，多种高分辨率的分子分型系统发展起来，主要应用在医院和社区感染中真菌病原体的流行病学追踪，也用于研究不同地区分离株的差异，或传统方法鉴定不明确的真菌。

(一)次盾贫目

通过多基因种系比较，发现次盾贫目中一些重要的表型已独立进化多次，大多数枝孢瓶霉成员组成的一个群分为 2 个主要的进化支（*carrionii* and *bantiana* clades）[27]。

在一项外瓶霉属的营养缺陷型和嗜神经成员的研究中，用 ITS 序列分析、M-13 指纹和 SSU 内含子检测真菌的分子多样性，把皮炎外瓶霉划分为 2 个群，这 2 个群中分别集合了环境株和临床株。值得注意的是，东亚的临床株能引起严重的脑部感染和散播性感染，而同一群中来自东亚以外的菌株只引起轻症的真菌血症[37]。

着色霉属是着色芽生菌病最常见的一种病原体，但它在自然界中的分布仍不明确。其感染途径可能为创伤接种，为明确感染的来源和具体方式，一项研究使用随机扩增多态性 DNA 的方法，将形态类似的环境来源的着色霉属样真菌进行分型，结果表明，菌株具有高度多样性，且大多数从有症状患者所处环境分离出的菌株，与枝孢瓶霉的亲缘关系比着色霉属更高[42]。

(二)座囊菌目

用针对 4 个位点的多位点分型法，将双间新柱顶孢分为至少 5 型，其中 2 型只包括了植物分离株，另外 2 型只包括临床株，剩下的 1 个型属于人和芒果树的分离株。在一起农场工人足菌肿的暴发流行中，芒果树被确定为感染源，因此，芒果树已被认为是真菌可能的储存宿主[185]。

(三)小囊菌目

很多分子研究都揭示不同来源的赛多孢霉分离株具有高度的遗传多样性（参见文献[159]）。根据最近的多位点序列分析结果，可知这种遗传多样性是由于波氏假阿利什菌复合群中有太多尚未明确的种所致[72-73]。相反，多育节荚孢霉几乎没有什么遗传多样性。

(四)长喙壳目

与赛多孢霉属一样，分子水平的很多研究显示孢子丝菌存在高度的种内变异（参见文献[82]），分离株主要根据它们的地理来源分组。但最近多位点研究显示，广义的申克孢子丝菌包括了几种无论在系统发生还是形态学上都不相同的种，它们的地理分布也明显不同，例如，巴西孢子丝菌分离株主要在巴西，而所有来自印度的分离株经分子检测都属于球形孢子丝菌[81,83-84]。许多作者认为这可能与申克孢子丝菌的遗传和形态的多样性有关。

(五)格孢腔目

在一次由喙明脐菌导致的医源性中枢神经系统感染中，用全基因组序列分析评估了该次暴发流行的感染来源[186]，结果发现感染源来自新英格兰化合物中心（New England Compounding Center，NECC）生产的、被真菌污染的甲基强的松龙药瓶。该研究以全基因组测序检测不同真菌分离株的单核苷酸多态性（Single nucleotide polymorphisms，SNPs），将得到的序列进行系统分析，所测定的真菌包括从脑膜炎和其他感染的患者分离的 22 株、从受污染的 NECC 小瓶中分离出的 6 株及与疫情无关的 7 株。研究发现，所有与暴发流行相关的 28 个菌株，基因组几乎完全相同，都是 33.8Mb；28 个菌株中共检测到 8 个 SNP，但能把这 28 个基因组区分开的 SNP 仅有 2 个。这 28 个菌株的基因组与另一株与本次暴发无关的喙明脐菌完全不同，后者大约有 136 000 个 SNP[186]。

九、血清学试验

用于检测申克孢子丝菌抗体的乳胶凝集试验的商品化试剂盒(Immuno-Mycologics 股份有限公司,Norman,OK)已经上市,该试剂盒在辅助诊断申克孢子丝菌的播散性感染时尤为有效。尽管一项研究显示其具有 90%~94%的敏感性和 95%~100%的特异性[187],但试剂盒仍未得到广泛应用。对于中枢神经系统孢子丝菌病,当经典的培养方法无法诊断时,血清学抗体的检测很有诊断意义[188]。

十、抗菌药物敏感性试验

(一)体外试验

暗色真菌体外药敏实验的数据与日俱增,目前临床常见真菌的药物敏感性都已清楚。但药敏判定的折点仍未确定,药敏结果的临床意义也基本是不明确的。

两性霉素 B 对大多临床常见的暗色真菌具有较好的体外抗真菌活性,如外瓶霉属[189]和链格孢[190]。但也有些真菌,包括赛多孢霉属的成员、布朗帚霉(*Scopulariopsis brumptii*),在体外药敏试验中对其显示持续的抗性[145,191-192]。一般而言,唑类的药物在体外试验中对除多育节荚孢霉外的暗色真菌(见文献[111]综述)都有持续的抗真菌活性[193]。

新一代三唑类泊沙康唑和伏立康唑的抗真菌活性广泛,对本章涵盖的大多数真菌都有活性。这些三唑类抗真菌药物,与其他治疗着色芽生菌病[194]和抗波氏假阿利什菌复合群的药物[193]活性相似。泊沙康唑对链格孢[190]、外瓶霉属[189]和孢子丝菌[195]的活性比伏立康唑好,但两种药物抗孢子丝菌的作用都较弱。伏立康唑抗真菌活性较强,在美国一次医源性喙明脐菌中枢神经系统感染的暴发流行中曾被使用[196]。艾沙康唑对多种致病性暗色真菌具有较好的体外抗真菌活性,例如链格孢属、离蠕孢属、枝孢霉属、弯孢霉属、外瓶霉属、着色霉属和瓶霉属,但对赛多孢霉属和多育节荚孢霉无效[197]。特比萘芬在体外试验中表现出对丝状真菌显著的杀菌效果,最近不断有新研究发现,其对暗色真菌包括链格孢和弯孢霉属也有广泛的抗真菌活性[111]。棘白菌素对不同暗色真菌的抗菌活性程度不同,具有种属特异性[198]。米卡芬净对赛多孢霉属呈现适度的抗菌作用[192]。目前常见的抗真菌药物对暗色真菌的体外抗菌作用在 Revankar 和 Sutton[111]发表的综述中有详尽阐述。

(二)动物模型体内试验

本章中大多数真菌的感染在临床上并不多见,目前也尚无理想的治疗方案。因此,很多研究使用感染动物模型,来评估体外抗真菌试验中得到的研究结果和抗真菌药物的治疗效果。动物实验结果显示,泊沙康唑是治疗少见霉菌感染的最有效药物,其中包括本章涵盖的一些真菌(见参考文献[199]综述)。

1. 着色芽生菌病 最近,在着色芽生菌病的动物模型——无胸腺小鼠的研究中发现,泊沙康唑与推荐的治疗药物伊曲康唑、特比萘芬相比,对裴氏着色霉[200]和卡氏枝孢瓶霉[201]有更高的抗真菌活性,而伏立康唑对裴氏着色霉没有效果。

2. 赛多孢霉病和多育节荚孢霉感染 体外 MIC 测定显示,伏立康唑和泊沙康唑对波氏赛多孢霉,尖端赛多孢霉和桔黄赛多孢霉有抗真菌作用,而两性霉素 B 则无效。尚未发现治疗多育节荚孢霉感染的有效抗真菌药。在多育节荚孢霉感染的小鼠中观察了二联或三联抗真菌药物的治疗效果,发现米卡芬净加伏立康唑或两性霉素 B 治疗效果最好,能延长小鼠的生存时间并减少肾和脑中真菌的数量。而以上 3 种药物联用无效[202]。在少数临床案例中,特比萘芬与伏立康唑联用显示出协同作用,取得了较好的治疗效果[162]。

3. 暗色丝孢菌病 目前,很多动物实验评估和筛选了对播散感染的真菌作用最强的药物,结果发现,对于单孢着色霉[203]和皮炎外瓶霉[204],泊沙康唑比两性霉素 B 和伊曲康唑更有效。在双间新柱顶孢的试验治疗中,两性霉素 B 比泊沙康唑和伏立康唑更有效[205]。用班替枝孢瓶霉感染的小鼠模型,测定了两性霉素 B、米卡芬净、伏立康唑、氟胞嘧啶和泊沙康唑在单用、二联和三联使用时的治疗效果。结果发现,三联用药(泊沙康唑、米卡芬净和氟胞嘧啶)是唯一能使动物生存时间

延长至少10个月的治疗方案[206]。

4. 孢子丝菌病 在孢子丝菌病最常见的2种病原真菌申克孢子丝菌和巴西孢子丝菌的实验感染中，泊沙康唑显示了优越的抗真菌活性[207]。

十一、结果的评价、解释和报告

至少有100种暗色真菌能引起人和动物的感染，但实际在临床中这些真菌却很少见。因此，临床医生对这些真菌并不熟悉，常被漏诊。在健康人和缺乏免疫力的患者中，被确诊为暗色真菌感染的病例逐渐增多，显而易见，其中涉及的致病性真菌种类也在不断增加。

有很多暗色真菌可在临床标本中作为污染菌被偶然分离，因此，确定特定的一株真菌是否参与致病并不容易。如反复分离出同一种可疑真菌，则提示感染，而临床标本和分离株的真菌DNA序列分析极其有诊断意义。如从通常无菌的部位分离出暗色真菌，则不能作为污染物摒除，特别是菌落很多或多个培养平皿中都有该真菌的生长时。从非洁净的呼吸道标本如皮肤、痰或支气管灌洗液中分离出条件致病性真菌，如枝孢瓶霉属、着色霉属、赛多孢霉属和疣霉属等，若排除污染，则高度提示感染。应联系组织病理学和真菌培养结果最终确定诊断。

手术时取到真菌感染组织却未送检真菌培养，是临床上一个越来越突出的问题，因此为保险起见，临床医生应当申请真菌培养。未来需要直接从组织块中将真菌鉴定到属的水平，免疫组化、DNA原位杂交或DNA测序等方法在快速检测和鉴定真菌中将有较好的应用前景。

参考文献请扫二维码查阅

第128章　导致真菌性足菌肿的病原真菌*

SARAH ABDALLA AHMED, G. SYBREN DE HOOG, WENDY W. J. VAN DE SANDE

（付英梅　译；徐和平、陆玲　审校）

2016年，世界卫生组织将真菌性足菌肿（Eumycetoma）定义为一种被忽视的热带病[1]。真菌性足菌肿是一种由真菌引起的皮下组织慢性、肉芽肿性、进行性疾病，以病变组织中形成大量由真菌成分组成的颗粒为显著特征，颗粒可经窦道排出。真菌性足菌肿在热带和亚热带多见；温带地区则少见，病例通常是来自热带地区的移民。某些透明真菌和暗色真菌能引起真菌性足菌肿。致病真菌的分布受降雨量等气候因素的影响很大，也受社会经济条件的影响。

一、病原体特征与分类

目前的DNA序列分析结果证明，导致足菌肿的所有真菌在分类上均属于子囊菌门，虽然其中一部分并不产生子囊[2]。根据核糖体小亚基[3]和内部转录间隔区（internal transcribed spacer，ITS）的DNA序列可确定这些真菌的种属相关度[4]（表128-1，下文按目列出）。本章涉及的致病性真菌主要是人和低等动物足菌肿中最常见的种属；对于足菌肿以外其他疾病的常见致病真菌，详见本书相应章节的内容。

（一）粪壳菌目（Sordariales）

马杜拉菌属（*Madurella*）　足菌肿马杜拉菌（*Madurella mycetomatis*）是真菌性足菌肿最常见的致病菌[5]（图128-1 a～c），常见于非洲干旱气候区（苏丹、马里和吉布提），偶见于中东和印度。足菌肿马杜拉菌的分类是通过多个种系分类学方法联合确定的，包括线粒体基因组DNA测序、核糖体DNA（rDNA）基因间隔区（ITS）、β-微管蛋白基因（*BT2*）和RNA聚合酶Ⅱ亚基编码基因（*RPB2*）[3,6-7]。该菌苏丹分离株（MM55）的全基因组测序已经完成，测序数据储存在韦斯特迪克（Westerdijk）真菌生物多样性研究所的CBS-NKAW保藏中心，编号为CBS 131320[8]。

根据ITS、*BT2*和*RPB2*的测序分析结果，发现马杜拉菌属的一些新成员曾被误鉴定为足菌肿马杜拉菌。这些新成员包括假足菌肿马杜拉菌（*Madurella pseudomycetomatis*）、热带马杜拉菌（*M. tropicana*）和费赫勒马杜拉菌（*M. fahalii*）[7,9]。其中，费赫勒马杜拉菌对抗真菌药物的耐药性最强。马杜拉菌的种属鉴定只能依靠分子生物学方法，因此，在曾经的足菌肿病例报道中，难以判定致病菌除了足菌肿马杜拉菌外是否还包括本属的其他成员。假足菌肿马杜拉菌已在意大利[7]、委内瑞拉[10]和中国[9]被发现。

（二）格孢腔目（Pleosporales）

1. 塞内加尔镰孢菌（*Falciformispora senegalensis*）［以前的塞内加尔小麦小球腔菌（*Leptosphaeria senegalensis*）］和汤普金镰孢菌（*Falciformispora tompkinsii*）［以前的汤普金小麦小球腔菌（*L. tompkinsii*）］　联合核糖体小亚基（SSU）、核糖体大亚基（LSU）、*RPB2*和翻译延长因子1-α（*TEF1*）基因的DNA序列分析，发现塞内加尔小麦小球腔菌和汤普金小麦小球腔菌聚集在格孢腔菌的陷球壳科（Trematosphaeriaceae），与木镰孢菌（*Falciformispora lignatilis*）的亲缘关系最近，由此，这2种真菌被分别更名为塞内加

---

*本章包含Abdalla O. A. Ahmed、G. Sybren de Hoog和Wendy W. J. van de Sande在本手册第11版第125章所呈现的部分内容

表 128-1　真菌性足菌肿致病真菌一览表

目	种	分离株数[1]	流行程度[2]	颗粒颜色	颗粒大小(mm)	地理分布	参考文献
粪壳菌目	足菌肿马杜拉菌(*Madurella mycetomatis*)	2302	C	黑	≥5.0	东非,中东,印度	5,12, 47
格孢腔目	塞内加尔镰孢菌(*Falciformispora senegalensis*)	167	O	黑	0.5~2.0	西非和印度	5,12,146
格孢腔目	灰色限球壳(*Trematosphaeria grisea*)	116	O	黑	0.3~0.6	南美和印度	5, 11, 14, 19, 20, 147-151
小囊菌目	尖端多孢霉复合群(*Scedosporium apiospermum* complex)	83	O	白	0.2~2.0	南、北美洲,印度	5, 36, 37, 152-157; 第 127 章
格孢腔目	*Medicopsis romeroi*	22	O/R	黑			5,11,23-25,126,151
格孢腔目	马金黑棘孢(*Nigraograna mackinnonii*)	7	O/R	黑	0.3~1.0	中美洲与南美洲	5,11,151
肉座菌目	基利帚枝霉(*Sarocladium kiliense*)[曾用名:基利枝顶孢(*Syn. Acremonium kiliense*)]		R	白			
肉座菌目	累西腓枝顶孢(*Acremonium recifei*)		R	白			158
散囊菌目	黄曲霉(*Aspergillus flavus*)	2	R	绿、白			5,159,160,第 122 章
散囊菌目	烟曲霉(*Aspergillus fumigatus*)	2	R				5,第 122 章
散囊菌目	构巢曲霉(*Aspergillus nidulans*)	1	R	白			5,19,第 122 章
次盾臭目	班替枝孢瓶霉(*Cladiophialophora bantiana*)		R				161,第 127 章
次盾臭目	足菌肿枝孢瓶霉(*Cladiophialophora mycetomatis*)		R	黑	0.5		162,第 127 章
格孢腔目	多主棒孢霉(*Corynespora cassiicola*)		R	黑			163
格孢腔目	膝曲弯孢霉(*Curvularia geniculata*)		R	黑	0.5~1.0	全球分布	164,165,第 127 章
格孢腔目	新月弯孢霉(*Curvularia lunata*)		R	黑	0.5~1.0	全球分布	19,166-168,第 127 章
间座壳目	菜豆间座壳(*Diaporthe phaseolorum*)		R				169
格孢腔目	*Emmarelia grisea*		R	黑	0.3~0.6	印度,斯里兰卡	151
格孢腔目	*Emmarelia paragrisea*		R	黑	0.3~0.6	印度,斯里兰卡	151
次盾臭目	甄氏外瓶霉(*Exophiala jeanselmei*)	9	R	黑	0.5~1.0	全球分布	5, 142, 170, 171; 第 127 章
格孢腔目	汤普金镰孢菌(*Falciformispora tompkinsii*)		R	黑	0.5~1.0		11, 172
肉座菌目	镰状镰刀菌(*Fusarium falciforme*)	3	R	白	0.2~0.5	全球分布	5, 71, 173-176;第 123 章
肉座菌目	轮枝镰刀菌(*Fusarium verticillioides*)[曾用名串珠镰刀菌(*Fusarium moniliforme*)]		R	白			143, 177,第 123 章
肉座菌目	尖孢镰刀菌(*Fusarium oxysporum*)		R	白			第 123 章
肉座菌目	茄病镰刀菌(*Fusarium solani*)		R	白			178;第 123 章
酵母菌目	白地霉(*Geotrichum candidum*)	1	R				5;第 120 章
肉座菌目	锈腐柱隔孢(*Ilyonectria destructans*)		R	白			179
粪壳菌目	*Madurella fahalii*		R	黑			7
粪壳菌目	假足菌肿马杜拉菌(*Madurella pseudomycetomatis*)		R	黑			7, 9

（续 表）

目	种	分离株数[1]	流行程度[2]	颗粒颜色	颗粒大小(mm)	地理分布	参考文献
粪壳菌目	热带马杜拉菌(*Madurella tropicana*)		R	黑			7
瓜甲团囊菌目	奥杜盎小孢子菌(*Microsporum audouini*)	1	R	白			第126章
瓜甲团囊菌目	犬小孢子菌(*Microsporum canis*)		R				66，180-182；第126章
格孢腔目	罗萨梯新龟甲形菌(*Neotestudina rosatii*)	4	R	白			5
间座壳目	克氏暗色枝顶孢(*Phaeoacremonium krajdenii*)		R	白			87；第127章
间座壳目	寄生暗色枝顶孢(*Phaeoacremonium parasiticum*)		R				183；第127章
间座壳目	蓝色瓶霉(*Phialophora cyanescens*)		R	白			184；第127章
间座壳目	疣状瓶霉(*Phialophora verrucosa*)		R	黑			第127章
美球菌目	*Pleurostomophora ochracea*		R	黄		苏丹	80；第127章
格孢腔目	拉伦假性小毛球菌(*Pseudochaetosphaeronema larense*)		R	黑			
次盾菌目	墨绿喙枝孢(*Rhinocladiella atrovirens*)	2	R				5
纵裂菌目	*Rhytidhysteron rufulum*						14
格孢腔目	禾长蠕孢菌(*Setosphaeria rostrata*)		R				

注：[1] 分离株数量引自参考文献[5]，该研究对2704例真菌性足菌肿进行荟萃分析，其中220个真菌无种属鉴定结果。需注意，该研究中真菌的鉴定依据是组织学检查和(或)真菌培养；如应用分子鉴定法，每种真菌的分离株数量将有所变动。[2] 流行程度：C. 常见（世界流行率5%以上）；O. 偶发（世界流行率1%～5%）；R. 罕见（世界流行率1%）。流行率见参考文献[5]

尔镰孢菌和汤普金镰孢菌[11]。塞内加尔镰孢菌是一种暗色丝状真菌，真菌闭囊壳的大子囊中含有8个子囊孢子；子囊孢子呈椭圆形，有4个隔膜，受黏液鞘包裹[2]（图128-1d～f）。塞内加尔镰孢菌和与之近缘的汤普金镰孢菌导致的足菌肿见于以塞内加尔和毛里塔尼亚为代表的非洲北部热带地区，印度也有发生[12-14]。

2. 灰色限球壳(*Trematosphaeria grisea*)[曾用名灰色马杜拉菌(*Madurella grisea*)] 2004年，研究者们利用分子种系发生学和分子诊断方法，发现马杜拉菌属的种间差异较大[3]。Ahmed等通过rRNA限制性片段长度多态性方法和特异性ITS PCR技术，对马杜拉菌属进行了种间差异分析[15-16]。根据rDNA测序结果，灰色马杜拉菌被归为格孢腔目，因而不能认为其与粪壳菌目的足菌肿马杜拉菌为姐妹种。整合SSU、LSU、*RPB2*和*TEF1*的分子数据，可发现灰色马杜拉菌与穿孔限球壳(*Trematosphaeria pertusa*)位于同一个进化支[11]，两者在同一个属，因此，2013年，灰色马杜拉菌被正式命名为灰色限球壳[11]。在南美洲、印度、非洲和中北美洲，灰色限球壳被认为是病灶中有黑色颗粒的黑粒足菌肿(black grain mycetoma)的病原体[17-20]，但早期的一些报道中还需DNA序列分析从而进一步证实致病真菌的类别。这种真菌属于腔孢菌，但很可能没有分生孢子或子实体（图128-1g～i）。该真菌的种属鉴定需在严格无菌培养条件下使用分子生物学方法来完成。用分子方法鉴定了英国布里斯托尔国家病原真菌保存库(National Collection of Pathogenic Fungi，SCPF)和法国巴斯德研究所菌物保藏中心(Institute Pasteur Culture Collection，UMIP)保存的31株此类真菌，结果发现其中的28株实际上是其他导致足菌肿的格孢腔菌[8株马金黑棘孢(*Nigrograna mackinnonii*)，10株*Medicopsis romeroi*，4株*Rhytidhysteron rufulum*，5株*E. grisea*，1株*Emarellia paragrisea*][14]。

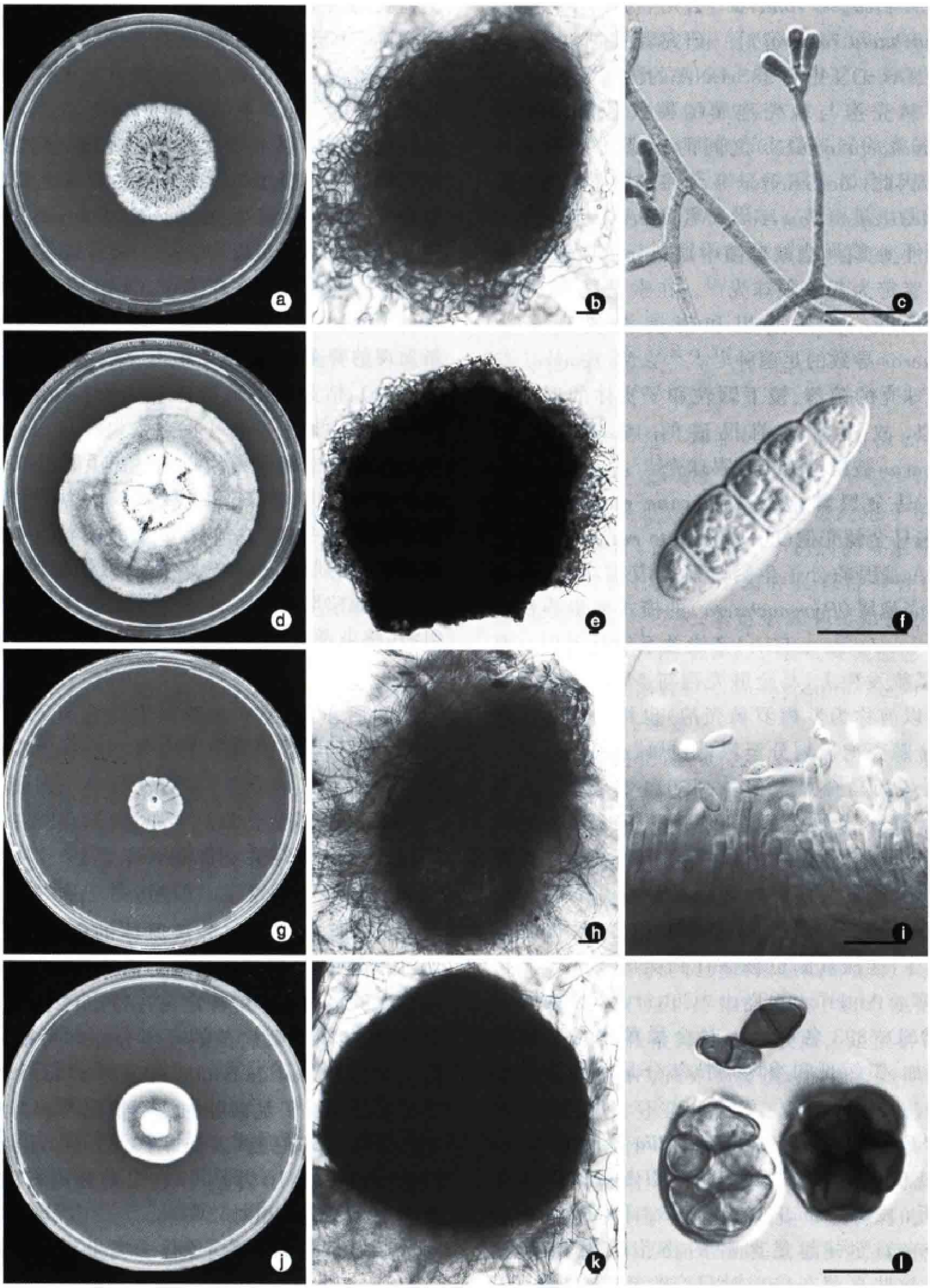


图 128-1　足菌肿病原真菌的培养特征

a. 足菌肿马杜拉菌(*M. mycetomatis*)在沙氏葡萄糖琼脂上的菌落；b. 足菌肿马杜拉菌，不育菌核；c. 足菌肿马杜拉菌，瓶梗和小分生孢子；d. 塞内加尔镰孢菌(*F. senegalensis*)在麦芽提取物琼脂上的菌落；e. 塞内加尔镰孢菌，子囊座；f. 塞内加尔镰孢菌，子囊孢子；g. 灰色限球壳(*T. grisea*)在麦芽提取物琼脂上的菌落；h. 灰色限球壳，含分生孢子的分生孢子器；i. 灰色限球壳，分生孢子梗和分生孢子；j. 罗萨梯新龟甲形菌(*N. rosatii*)在麦芽提取物琼脂上的菌落；k. 罗萨梯新龟甲形菌，子囊座；l. 罗萨梯新龟甲形菌，子囊和子囊孢子，见彩插

3. *Medicopsis romeroi* [曾用名罗梅罗棘壳孢(*Pyrenochaeta romeroi*)] 研究者根据对18S核糖体DNA(rDNA)和28SrDNA的测序分析,认为罗梅罗棘壳孢与棘壳孢属的模式种新棘壳孢(*Pyrenochaeta nobilis*)之间的亲缘关系相距甚远[21]。因此,de Gruyter等[22]将罗梅罗棘壳孢更名为*Medicopsis romeroi*。*M. romeroi*是一种腔孢纲无性型真菌,当培养菌中缺乏分生孢子器时,会被误鉴定为灰色限球壳[2]。在索马里、沙特阿拉伯、印度、巴基斯坦和南美洲发现了由*M. romeroi*导致的足菌肿[14,23-25]。*M. romeroi*与灰色限球壳的菌落、镜下颗粒和子实体的形态非常相似,故认为之前报道的10株非产孢*M. romeroi*被误定为灰色限球壳[14]。

4. 马金黑棘孢(*Nigrograna mackinnonii*)[曾用名马金棘壳孢(*Pyrenochaeta mackinnonii*)] rRNA基因的分子生物学研究表明,马金棘壳孢与棘壳孢属(*Pyrenochaeta*)的模式种贵族棘壳孢(*Pyrenochaeta nobilis*)亲缘关系较远[21-22]。而且,在系统发生上,马金棘壳孢与*Medicopsis romeroi*(以前称为罗梅罗棘壳孢)也相距较远。因此,马金棘壳孢被划分至黑棘孢属(*Nigrograna*)并被更名为马金黑棘孢[27]。2014-2015年,这个真菌曾被称为马金双室孢腔菌(*Biatriospora mackinnonii*)[11],但在2015年真菌分类学大规模修订后,又恢复其名称为马金黑棘孢[26]。已经完成了马金黑棘孢的内生菌分离株E5202H的全基因组测序,这株真菌也被储存到美国模式培养物集存库(American Type Culture Collection, ATCC)SD-6893名下[27]。马金黑棘孢是来自哥斯达黎加、墨西哥和委内瑞拉部分足菌肿患者的病原体。

5. *Emarellia grisea* 和 *Emarellia paragrisea* 经LSU、ITS、ACT、*RPB2*和*TEF1*基因序列联合分析,发现*Emarellia grisea*和*Emarellia paragrisea*与引起足菌肿的格孢腔菌聚成一簇[14]。这些真菌在培养时只产生不育的黑色菌丝。*E. grisea*在印度和斯里兰卡造成足菌肿病[14]。

6. 罗萨梯新龟甲形菌(*Neotestudina rosatii*) 罗萨梯新龟甲形菌是从热带地区的土壤中分离出来的一类真菌,属于子囊菌,子囊呈圆形、水溶性,子囊孢子菱形、一个隔膜[2](图128-1j~l)。有报道称在澳大利亚、喀麦隆、几内亚、塞内加尔和索马里发现了罗萨梯新龟甲形菌导致的足菌肿[25,28]。

(三)小囊菌目

赛多孢霉属 本属的成员不多,不同的赛多孢霉种间差异明显[29-31]。赛多孢霉最主要的2个种是波氏赛多孢霉(*Scedosporium boydii*)和尖端赛多孢霉(*S. apiospermum*)。是否应将它们认定为2个不同的种仍存在争议,Chen等[32]认为应把这2个真菌作为一个种复合群。此外,还有几种新发现的赛多孢霉,包括小孢赛多孢霉(*S. minustispora*)、桔黄赛多孢霉(*S. auranticacum*)和*S. dehoogii*[29-30]。

尖端赛多孢霉复合群常存在于肥料或受污染的环境中[33-34],早在1920年就被认为是人类足菌肿的病原体[35],主要在温带地区流行[36],发病部位通常在四肢[37]。当患者免疫力受损时,皮下感染常无颗粒形成[38]。此外,因这个真菌亲嗜软骨组织,感染者常有关节炎的表现[39-42]。

(四)其他目

引起足菌肿的病原体还有一部分罕见的真菌(表128-1)。

二、流行病学和传播

目前真菌性足菌肿病原体的种类在不断增加,而对它们的流行病学和传播方式还知之甚少。通过病例报告可了解特定菌在特定区域的发病情况,但不能明确致病菌的环境分布和可能的生态位。2013年van de Sande通过对8763个病例的荟萃分析估算了足菌肿的流行情况[5]。高流行国家包括毛里塔尼亚(发病率:3.49/10万)和苏丹(发病率:1.81/10万)[5]。在足菌肿流行的国家,乡村地区发病率相对较高[5]。

真菌性足菌肿的病原体多腐生在植物较硬部位上,比如与土壤有关系的植物的尖和刺[43-46]。Segretain和Destombes等[28,47]通过使用特定的分离培养基和技术手段,发现50%刺槐树的干刺中可分离到塞内加尔镰孢菌和汤普金镰孢菌,尤其是被雨季的泥土沾染过的部位。据报道,沙地中可分离到罗萨梯新龟甲形菌[25],从土壤和蚁冢中则可分离足菌肿马杜拉菌[48-49]。但应注意,这

些真菌尚未得到分子生物学水平的鉴定,因此环境株与临床株很可能是不同的种。通过 ITS 测序方法,Badali 等重新对甄氏外瓶霉的临床株和环境株进行了鉴定[50],结果所有足菌肿及足菌肿样感染的病例中都鉴定到了甄氏外瓶霉,而环境株则是外瓶霉属的其他种,这提示外瓶霉属的某些种能特异性地侵袭人类。足菌肿马杜拉菌是专性对人致病的另一种真菌,是东非干旱地区以黑粒足菌肿为主要病征的常见病原体。足菌肿马杜拉菌不易从环境中直接分离[51],但在土壤和植物的尖和刺中可检出其 DNA。近期的系统发生研究发现,粪便也可能是足菌肿马杜拉菌的寄居地[52]。

Borelli 从委内瑞拉的土壤中分离出了一种不育真菌[53],并在研究报告中将其命名为灰色马杜拉菌(目前命名为灰色限球壳)。而这种罕见真菌的生态位和临床意义仍未确定。对于足菌肿马杜拉菌和赛多孢霉等相对常见的真菌,相似的表型背后常常隐藏着广泛的物种多样性,故单纯的表型鉴定不足以确定其流行病学特征(见上文中"病原体特征与分类")。

人类足菌肿的发病有地方性,但这种疾病在接触污染物品的人群中更为常见,如野外工作者、农民和渔民。有研究表明,足菌肿的患者虽无明显的免疫缺陷,但某些罕见的免疫缺陷确实与疾病相关[54-58],主要表现在宿主免疫系统功能基因的单核苷酸多态性,包括几丁质酶、壳三糖苷酶、补体受体 1(complement receptor 1,CR1)、CC 趋化因子配体 5(CC chemokine ligand 5,CCR5)、白介素 8(chemokines interleukin 8,CXCL8)和白介素 10(interleukin 10,IL-10)、白介素受体 CXCR2、金属蛋白酶 2 和 9、一氧化氮合酶 NOS2 和血小板反应素 4(thrombospondin-4);也包括与性激素合成相关的基因,例如,细胞色素 P450 亚家族 19(*CYP19*)基因和儿茶酚-O-甲基转移酶(*COMT*)基因[54-58]。患病人群中性激素合成相关基因的缺陷可从流行病学角度解释足菌肿患者男性多于女性的原因,这种发病上的性别差异也体现在其他条件致病性真菌上。

本病的发生具有明显地域性,通常集中在热带地区。足菌肿马杜拉菌感染局限在干旱和半干旱地区,而镰孢菌属感染则分布在雨林地区。温带地区的获得性足菌肿病常由尖端赛多孢霉复合群感染所致。美国和欧洲的由尖端赛多孢霉以外其他菌种导致的病例,常由热带地区移民输入。例如,de Hoog 等[59]报道的荷兰病例,致病真菌源于印尼和苏里南,Ahmed 等[15]报道法国的足菌肿马杜拉菌感染来源于马里。

足菌肿的流行和分布也受气候因素的影响。非洲和亚洲许多河流在每年雨季都会泛滥,这对病原体的分布具有重要影响。降雨量也通过改变有机物的分布,从而影响致病性真菌在不同地区的播散[60]。

三、临床意义

足菌肿[61]是一种非传染性的、机体局部的慢性肉芽肿病变,感染累及皮肤和皮下组织,在某些病例最终可侵犯到骨。病变通常局限于手或足,偶尔发生在背、肩和臀部。个别病例可累及头皮、眼、颌及口腔[9,62-64]。足菌肿具有特征性的三联症:无痛性皮下包块、窦道形成和排出粒状物(大量的真菌菌体)(图 128-2)。需氧放线菌感染引起的放线菌性足菌肿(Actinomycetoma)也可引起类似的症状,需注意鉴别。

人比动物更易患病。仅有少数文献报道了猫、狗、马、山羊等动物的感染[19,65-69],更多的病例则发生在健康人群。外科手术[70]和肾移植[71]中带菌外来物的植入也可导致足菌肿。

足菌肿可源自外伤,如带菌的棘刺、碎片、鱼鳞或鱼鳍刺伤、蛇和昆虫咬伤、农用器械和刀具污染的伤口。最初症状为真菌感染部位的不适和疼痛。数周或数月后,感染部位皮下组织硬化,形成脓肿和脓瘘,脓液排到皮肤表面。足菌肿的特点是肿胀、肉芽肿、脓肿和窦道,感染部位有包含真菌颗粒的脓性分泌物排出。真菌颗粒为足菌肿所特有,颗粒直径 0.2～5.0 mm 以上,颗粒的大小、颜色、形状和内部结构因感染菌种的不同而变化。来自宿主的物质可在颗粒四周形成特有的保护屏障将真菌包裹,从而帮助真菌抵御抗真菌药物和抗体等体液免疫因素的作用。

足菌肿通常在纤维硬化增厚的组织下层缓慢形成,含真菌的菌核在组织中崩解后,真菌可进一步侵犯肌肉及其内层组织,形成肉芽肿累及的部位可深达骨组织,导致骨质严重破坏、小空洞形成和骨重建。早期溶骨性损伤包括皮质边缘的缺失和骨表面的侵蚀。随着感染的发展,血管、淋巴管

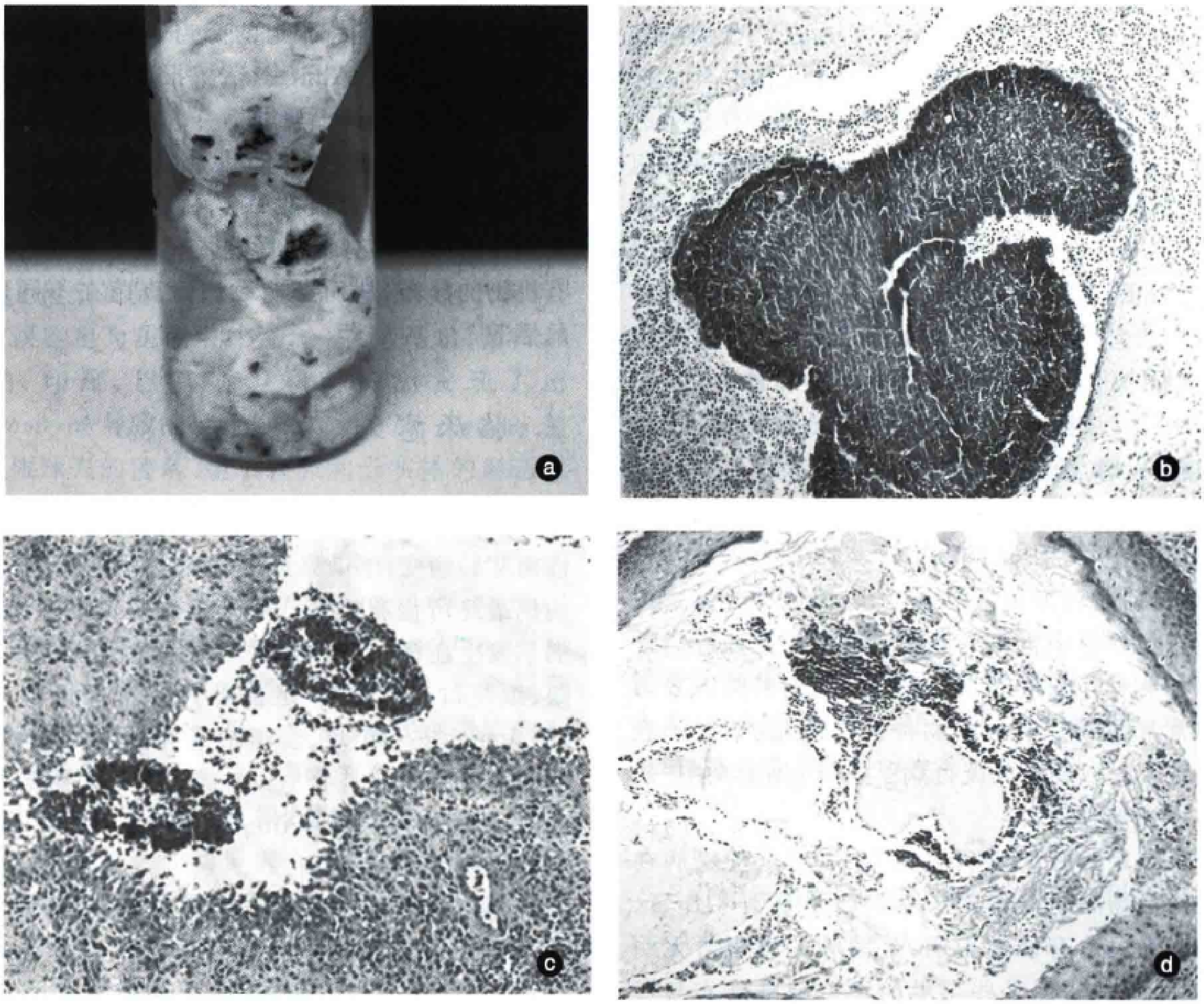


图 128-2 足菌肿的皮下组织真菌颗粒

a. 皮下组织的足菌肿马杜拉菌黑色颗粒，福尔马林固定，肉眼清晰可见颗粒，放大倍数：×1；b. 皮下组织足菌肿马杜拉菌黑色颗粒，苏木素伊红染色，放大倍数，×100；c. 皮下组织甄氏外瓶霉(*E. jeanselmei*)黑色颗粒，苏木素伊红染色[142]，放大倍数，×100；d. 轮枝镰刀菌(*Fusarium verticilloides*)白色颗粒，苏木素伊红染色[143]，放大倍数，×100，见彩插

和神经可能受损，继发的细菌感染和骨髓炎可致骨组织的彻底破坏。足菌肿的疼痛常与病变累及骨组织及继发细菌感染有关。

肺空洞中存在的真菌球有时被误称为足菌肿[72-73]。但这些菌球中缺乏结构成熟的真菌颗粒，应根据其中所含真菌病原体的种类，命名为曲霉菌球(aspergillomas)或直接称为真菌球[74]。皮肤和皮下组织中皮肤癣菌的菌丝聚集体与无颗粒发育的足菌肿也不同，前者菌丝聚集体无颗粒形成且周围有明显的 Splendore-Höeppli 现象(见下文“显微镜检查颗粒形态”部分)，滤泡上皮破裂后真菌从毛囊进入深部组织。这类由皮肤癣菌造成的感染称为假性足菌肿(pseudomycetomata)[75]。

四、样本的采集、运输和储存

可从真菌性足菌肿患者中采集多种不同的标本，但是病原真菌的直接检查和培养通常需要外科组织活检和(或)刮骨术取材。组织材料应分成 2 份送检，分别进行微生物学检查与组织病理学检查。应注意，当组织活检样本无肉眼可见的颗粒时，真菌培养结果通常也是阴性。术中切除或切开取材得到的活检组织是真菌培养的最佳样本。在局部麻醉的状态下取得的皮肤活检组织中有时无真菌颗粒。当切除的组织中含有真菌颗粒时，真菌培养也可以获得阳性结果。不建议用棉

拭子从窦道中获取真菌颗粒，因为这种取材方法会污染感染组织中的真菌颗粒甚至导致真菌死亡。

有些真菌颗粒可直接用于镜检和培养，条件允许时，应从感染部位尽量多取材。收集的组织应置于无菌干燥、密闭的容器中，室温下尽快送检。如果运输时间大于 2 h，样本应置于冰箱冷藏保存。但长时间的低温保存也会导致真菌培养失败。小的活检样本可用 2～3 ml 生理盐水覆盖其表面，防止样本在运输过程中干燥。

五、直接检测

(一)显微镜检查颗粒形态

真菌性足菌肿的颗粒由有隔菌丝构成，菌丝直径至少 2～5 μm。菌丝呈可扭曲状，形态和大小不规则。细胞壁增厚，特别是位于颗粒外周侧的真菌。常见囊泡，尤其在颗粒四周。依真菌种类的不同，某些颗粒中含有来自真菌和宿主共同产生的胶状物质，将菌丝包裹其中。Wethered 等[76]把足菌肿马杜拉菌颗粒周围包裹的这种胶状物质描述为高电子密度的无定形物，其中含有大小不同、有膜的囊状物。最近，Ibrahim 等[77]发现，足菌肿马杜拉菌感染形成的颗粒中含黑色素、重金属、蛋白质和脂质。有学者认为，足菌肿的颗粒成分在真菌致病和抗药中发挥了一定的作用[77-78]。颗粒可诱导机体免疫反应，被称为 Splendore-Höeppli 现象[61,75]，组织学观察可见颗粒周围有嗜酸性无定形沉积物形成。在小鼠的足菌肿模型中，也发现了类似的组织学变化[79]。

如表 128-1 所示，当感染组织中的真菌形成透明菌丝时，真菌颗粒呈白色或黄棕色[白粒足菌肿(white grain mycetoma)]；而在含黑色素真菌的病例中，颗粒为黑色[黑粒足菌肿(black grain mycetoma)]。迄今为止，只有一种黄粒足菌肿得到证实，但之前的病例中可能将其误诊为细菌性足菌肿[80]。对诸如基利枝顶孢(*Acremonium kiliense*)和茄病镰刀菌蓝色变种(*Fusarium solani* var. *coeruleum*)等这些可合成黑色颗粒[81]的透明真菌，相应感染的报道中很可能存在误诊的情况。膨胀暗色枝顶孢和尖端赛多孢霉等具有暗色菌丝或孢子的真菌在组织中形成白色颗粒[46,82-84]。暗色枝顶孢的菌丝和孢子中都可合成黑色素，而在赛多孢霉中深色色素的沉着仅限于孢子内部。

1. 黑色颗粒　足菌肿颗粒的黑色是由其中的黑色素形成的，这些真菌的黑色素是一种锚定于细胞外的高分子量蛋白成分。子囊菌中合成黑色素的前体是 1,8-二羟基萘(DHN-黑色素)[61,85]。

(1)足菌肿马杜拉菌：足菌肿马杜拉菌中，黑色素是通过 DHN 通路合成的，它可赋予真菌抵抗强氧化剂和抗真菌药物的能力[78]。

不同马杜拉菌产生的黑色素既相似又有所差异。足菌肿马杜拉菌产生的颗粒为红棕色至黑色(图 128-2a 和 b)，直径可达 5 mm 以上，质地坚硬。组织切片中观察到的硬粒致密，大小和形状多变，常为多叶。硬粒直径 12～15 μm，周边含有直径 1.2～5.0 μm 的末端膨大菌丝。细胞壁中色素较少，但菌丝细胞含棕色颗粒，被包绕在棕色的基质中，此为足菌肿马杜拉菌的典型特征。某些真菌颗粒为囊性，大小和形状更规则。在颗粒周边的致密灰色胶样基质中，小囊泡多见。

(2)镰孢菌属：引起足菌肿的两种镰孢菌产生极为相似的真菌颗粒。颗粒黑色，0.5～2.0 mm 大小，质坚硬。组织切片中的颗粒呈圆形或多叶状，有大囊泡。颗粒周边的菌丝嵌入黑色的胶状物质中。颗粒的中心部分含菌丝形成的疏松网状结构。

(3)灰色限球壳：颗粒黑色、直径 0.3～0.6 mm、质地柔软或坚硬。组织切片中的颗粒呈椭圆、多叶或肾形，有时呈蠕虫状。颗粒中心含有由浅色菌丝构成的致密网状结构，因这部分区域的细胞间有棕色胶样物质分布，颗粒四周为棕色至黑棕色。

(4)*M. romeroi*：*M. romeroi* 形成质地柔软或坚硬的黑色颗粒，呈椭圆形、分叶状，有时呈蠕虫状，直径大约 1.0 mm。与灰色限球壳相似[86]。

(5)膝曲弯孢霉：膝曲弯孢霉的颗粒为黑色至深棕色，质坚硬，直径 0.5～1.0 mm 或更大。组织切片中的颗粒为球形、卵圆形或不规则形状，表面常围绕上皮样细胞。颗粒边缘为高密度且相互缠绕的暗色菌丝物质，厚壁的厚垣孢子样细胞嵌在胶样物质中。颗粒内部为空泡状，含疏松的有隔菌丝交错形成的网格。新月弯孢霉产生的颗粒与膝曲弯孢霉相似。

(6)甄氏外瓶霉：在宿主组织中，甄氏外瓶霉

的颗粒为深棕色至黑色，形状不规则，质地脆（图128-2c）。通常在巨细胞中可发现颗粒的脱落部分或碎片。当真菌颗粒从瘘管中排出时，其细长的形状和不规则的表面形态，使它们看上去似蠕虫。组织切片中观察到的颗粒为蠕虫状空心结构或弯曲索道样。颗粒外表面由棕色厚壁的菌丝和厚垣孢子样细胞构成，无胶样物质。在空心颗粒中，可见更小的、退化的菌丝片段及白细胞和巨细胞。

2. 白色颗粒

（1）赛多孢霉属：赛多孢霉属在组织中形成的真菌颗粒呈白色或黄白色，质地柔软或坚硬，球形、近球形或叶状，直径 0.2～2.0 mm。颗粒中的透明菌丝直径 1.5～5.0 μm，直径为 15～20 μm 的厚壁细胞从中间向周边呈放射状排列。每个真菌颗粒中央有松散交织的透明菌丝体。

（2）镰刀菌属：镰刀菌产生的颗粒呈白色至土黄色，质软，直径 0.2～0.5 mm（图 128-2d）。颗粒中含有柔软、多形性的有隔菌丝，菌丝直径 1.5～2.0 μm，有不规则的球状膨大，周边有胶状基质。

（3）罗萨梯新龟甲形菌：颗粒为白色至灰白色，直径 0.5～1.0 mm，质软。组织中形成的颗粒为多面形或不规则状，有菌丝嵌入周围的胶状物中。颗粒边界呈嗜酸性染色。硬粒中心或多或少含有破碎的菌丝和厚垣孢子。

（4）暗色枝顶孢属：暗色枝顶孢是一种暗色真菌，也是众所周知的引起皮肤暗色丝孢霉病的病原体，但在导致真菌性足菌肿时，有时并不产生黑色素。Hemashettar 等[87]报道了由克氏暗色枝顶孢（*P. krajdenii*）引起的白色颗粒足菌肿。

（二）抗原检测

尽管目前尚无针对真菌性足菌肿病原体的商品化抗原检测手段，但泛真菌性抗原（1, 3）-β-D 葡聚糖的检测，可作为疾病进程的监测方法（第119章）。已在真菌性足菌肿患者血清中检测这一指标[88]。但（1, 3）-β-D 葡聚糖属于泛真菌性抗原，不能鉴定真菌的种属[88]。此外，在放线菌引起的足菌肿患者血清中，（1, 3）-β-D 葡聚糖也有升高，故不能区分真菌性足菌肿和放线菌性足菌肿[88]。

（三）核酸检测方法

目前，某些真菌已有相应的分子检测方法，但多数用于经培养后菌种的鉴定。最近发展了一种从足菌肿马杜拉菌感染颗粒中直接分离 DNA 的方法，将分离的真菌颗粒与直径 2 mm 的金属研磨珠混合，用打珠器研磨 2 min，研磨裂解液中 DNA 的提取可选用 Qiagen 的植物 DNA 提取试剂盒 DNeasy 或 Zymo Research 的真菌/细菌 DNA 提取试剂盒 ZR[89]。已有经典 PCR 技术[16]和等温扩增技术用于足菌肿马杜拉菌的鉴定，例如滚环扩增[90]、环介导等温扩增[89]和重组酶聚合酶等温扩增技术[89]。

基于 PCR 技术的诊断方法可从感染组织中快速检测尖端赛多孢霉[91-92]。Willinger[93]等用分子技术从上颌窦瘘管的真菌球中鉴定尖端赛多孢霉和与之类似的致病真菌。也建立了直接从呼吸道标本中检测赛多孢霉属的多重 PCR 方法[94]（第127章）。

六、分离程序

为最大程度地从真菌性足菌肿感染组织中获得病原真菌的纯培养物，需用含青霉素和链霉素等抗菌药物的盐水反复清洗取材的真菌颗粒。而后在含氯霉素（50 mg/L）的沙氏葡萄糖琼脂（Sabouraud's glucose agar，SGA）及含氯霉素和放线菌酮（500 mg/L）的 SGA 平板上培养。孵育温度分别为 25 ℃和 37 ℃。因多数导致足菌肿的真菌生长缓慢，平皿应至少培养 4 周，报告呈阴性结果后废弃平皿。对所分离真菌的鉴定依赖于长出的子实体和分生孢子的形态特征。

七、鉴定

（一）形态学鉴定

绝大多数导致足菌肿的真菌，可通过下文和第 122、123、126 和 127 章中所描述的各种形态学特征进行鉴定。如需了解其他形态学特征和简便的鉴定方法，可参照真菌方面的专业工具书，例如《临床真菌图谱》（*Atlas of Clinical Fungi*）[2]。单纯依靠形态学曾导致很多真菌的鉴定错误，现在证明分子方法在真菌的种属鉴定中是最为可靠的手段[14]。

1. 足菌肿马杜拉菌 足菌肿马杜拉菌培养时

形态较多变。生长缓慢，菌落初为白色，逐渐变成橄榄绿色、黄色或棕色；菌落表面平或呈穹顶状，表面绒毛状或光滑，常有扩散性的锈棕色色素(图 128-1a)。在贫营养培养基中，形成的硬粒直径 750 μm，黑色，含有形态一致的多边形细胞(图 128-1b)。SGA 培养基中的菌丝为无性菌丝。在贫营养培养基中，如土壤提取物或干草提取物琼脂中，大约有 50%的真菌分离株的瓶梗尖端可产生圆形到梨形、直径 3～4 μm 的分生孢子。瓶梗尖端变细，长度 3～15 μm，常有不明显的囊领(图 128-1c)。

2. 镰孢菌属 塞内加尔镰孢菌和汤普金镰孢菌培养时生长迅速，产生的菌落为灰棕色(图 128-1d)。前者最适生长温度为 33 ℃，后者为 36℃[11]。在玉米琼脂上，两者均产生无天然孔口的子囊座，子囊座分散在培养基表面或植入内部，球形或近似球形，黑色，表面覆盖棕色、光滑弯曲的菌丝(图 128-1e)。在植物的茎上长时间培养，形成的子囊由 8 个孢子组成，棒状或圆柱形，具有双层囊壁。两者的差异在于孢子囊孢子的大小、形状、分隔方式和包绕在外的胶状鞘有所不同[13,95](图 128-1f)。

3. 灰色限球壳 灰色限球壳培养时生长缓慢，菌落表面柔软光滑、具有大脑样放射状沟回，颜色可为深灰至黄褐色、甚至黑色(图 128-1g)。菌落背面为黑色。最适生长温度为 30 ℃，37 ℃不生长[11]。显微镜下见颜色深浅不一的棕色有隔菌丝，直径 1～3 μm，无孢子形成。少有厚垣孢子。经常形成直径 3～5 μm 的较大的念珠样菌丝。灰色限球壳的某些分离株能产生产孢或不产孢的分生孢子器[86,96]，这些分离株与马金黑棘孢(*N. mackinnonii*)在形态上无法区分[97-98]，但 rRNA ITS 序列分析表明两者具有较大的种间差异[3]，且马金黑棘孢最适生长温度为 24 ℃，低于灰色限球壳的最适生长温度[11]。灰色限球壳的环境分离株培养时生长迅速，培养 8 周时产生载孢体(分生孢子器)(图 128-1i)。

4. *M. romeroi* 培养时生长迅速，菌落表面絮状或绒毛状，表面灰色，边缘白色。菌落背面黑色，色素集中。最适生长温度为 33 ℃。在贫营养培养基如燕麦琼脂上，用近紫外光照射，经 3～4 周形成分生孢子器。分生孢子器近似球形，直径 80～160 μm，暗砖色或浅褐色，而后变为深棕色带有短颈的结构。分生孢子器有开口，开口周围可见粗糙的有隔刚毛，大小为(80～100) μm×3 μm。载孢体里的分生孢子梗稀疏，侧面有分枝。透明的产孢细胞从无性子实体空洞内壁表层细胞直接产生或以侧枝形成，产生的分生孢子呈透明或浅黄色，短柱状，大小为(1～2) μm×1.0 μm。

5. 赛多孢霉属 赛多孢霉属的菌落生长迅速，初始培养呈白色絮状，当分生孢子生成时颜色变为灰色。随着菌落生长，逐渐变成深灰褐色。当分离物在玉米琼脂培养基上生长时，可产生内陷的子囊果(闭囊壳)，显微镜下为黑色小点。球状，无孔，直径 140～200 μm，表面常为棕色，壁厚，有隔菌丝 2～3 μm 宽。壁 4～6 μm 厚，含 2～3 层交织排列的扁平深棕色细胞，每个细胞 2～6 μm 宽。闭囊壳在成熟期打开，壁不规则裂开。含有 8 个孢子的子囊为椭圆形或近球形，大小为(12～18) μm×(9～13) μm。子囊孢子为椭圆形至扁圆形，对称，微扁平，大小(6～7) μm×(3.5～4.0) μm，稻草色，有 2 个胚芽孔。无性型的分生孢子呈椭圆形或纺锤形，底部平截，半透明，浅灰色或淡棕色，单生，聚集在环痕梗顶端。产孢细胞尖端膨大可见到环痕梗。有些分离株可产生无性型的黏束产孢，其特点为环痕产孢的菌丝束状聚集。菌丝融合成束，称为束丝。生成的分生孢子透明，圆筒状至棒状，基底部平截。有拉长的、多细胞分生孢子的人型多孢霉(*Polycytella hominis*)[99]，最近被证明是波氏赛多孢霉退化的无性型[100]。

6. 罗萨梯新龟甲形菌 培养时生长缓慢，培养 2 周后直径生长到 25～28 mm，具有浅灰色到黑褐色的气生菌丝体(图 128-1j)。在马铃薯-胡萝卜或玉米粉琼脂培养基上 30℃培养，子囊果多数内陷在培养基中(图 128-1k)。子囊果壁光滑，被互相交织的棕色或透明菌丝包绕。内含 8 个子囊孢子，大小为(12～35) μm×(10～25) μm，子囊孢子分布于子囊果中心部位(图 128-1l)，球形或近似球形，壁厚，双囊壁，在子囊孢子成熟时逐渐消失。子囊孢子的大小为(9～12.5) μm×(4.5～8.0) μm，外形从椭圆形至扁菱形、不对称形到轻微弯曲；子囊孢子中央分隔有缩缢，有棕色光滑的细胞壁。

(二)同化试验

仅依据形态特征鉴定足菌肿的致病真菌非常

困难。因此,可用很多生化分析方法辅助真菌的鉴定(表128-2)。足菌肿马杜拉菌在30 ℃的生长速度不如37 ℃生长的好,最高可在40 ℃生长,而灰色限球壳在30 ℃下生长优于37 ℃。足菌肿马杜拉菌有缓慢的蛋白水解作用,可利用葡萄糖、麦芽糖和半乳糖,不能利用蔗糖;可利用硝酸钾、硫酸铵、天冬酰胺和尿素,能水解淀粉。灰色限球壳则分解蛋白作用较弱,可同化葡萄糖、麦芽糖和蔗糖,但不能同化乳糖(表128-2)。

表 128-2 足菌肿致病真菌的碳源同化类型

试验*	足菌肿马杜拉菌 (*M. mycetomatis*)	塞内加尔镰孢菌 (*F. senegalensis*)	汤普金镰孢菌 (*F. tompkinsii*)	灰色限球壳 (*T. grisea*)	*M. romeroi*	马金黑棘孢 (*N. mackinnonii*)
37 ℃生长情况	+	+	+	−	+	−
底物同化能力:						
D-半乳糖	+	+	+	+	+	+
乳香酮	ND	+	+	+	+	−
D-蔗糖(蔗糖)	+/−	+	+	+	+	+
N-乙酰氨基葡萄糖	+	+	+	+	+	+
DL-乳酸	ND	−	−	−	−	−
L-阿拉伯糖	+	+	−	−	−	+/−
D-纤维二糖	+	+	+	+	+	+
D-棉子糖	W	+	+	+	+	+
D-麦芽糖	+	+	+	+	+	+
D-海藻糖	+	+	+	+	+	+
2-酮葡萄糖酸钾	+	−	+	+	+	+
甲基-D-吡喃葡萄糖苷	+/−	+	+	+	−	+
D-甘露醇	+	+/−	+	+	+	+
D-乳糖	+	+	−	−	−	−
肌醇	+/−	+/−	−	+	+	+
D-山梨醇	+	+/−	−	+	+	+
D-木糖	+	+	+	+	+	+
D-核糖	+	−	−	−	−	+/−
甘油	+/−	−	−	−	−	−
L-鼠李糖	+	+	+	+	+	+
异麦芽酮糖	ND	+	+	+	+	+
赤藓糖醇	+/−	−	+	+/−	+	+
D-褪黑糖	−	−	+/−	+	+/−	+
葡萄糖醛酸钠	ND	−	−	−	−	+/−
D-松三糖	W	+	+	+	+	+
葡萄糖酸钾	+	−	−	−	−	−
乙酰丙酸	ND	−	−	+/−	−	+
D-葡萄糖	+	+	+	+	+	+
L-山梨糖	W	+	W	+	+	−
氨基葡萄糖	+	−	−	−	−	−
七叶苷	−	+	+	+	W	+
耐盐试验(NaCl)	ND	20%	20%	20%	20%	20%
漆酶试验	ND	+	−/W	+	+	+
尿素酶试验	ND	+	+	+	+	+

注:* 各试验结果见文献[11]。+. 阳性;−. 阴性;W. 弱阳性;+/−. 阳性或阴性;ND. 未测试

真菌性足菌肿的格孢腔目致病菌，包括塞内加尔镰孢菌、汤普金镰孢菌、灰色限球壳、*M. romeroi*、马金黑棘孢和拉伦假性小毛球菌（*P. larense*），都能同化D-半乳糖、D-蔗糖、N-乙酰氨基葡萄糖、D-纤维二糖、D-棉子糖、D-麦芽糖、D-海藻糖、D-甘露醇、L-鼠李糖、D-松三糖、异麦芽酮糖和D-葡萄糖，但不同化DL-乳酸、葡萄糖酸钾、葡萄糖酸钠和氨基葡萄糖[11]。塞内加尔镰孢菌不同化2-酮基葡萄糖酸钾、赤藓糖醇或D-褪黑糖，而汤普金镰孢菌、灰色限球壳、*M. romeroi*、马金黑棘孢和拉伦假性小毛球菌能同化这几种物质[11]。此外，塞内加尔镰孢菌可同化D-乳糖，但多数其他的格孢腔目致病菌不同化乳糖。在这些致病菌中，仅汤普金镰孢菌不同化肌醇和山梨醇[11]，仅*M. romeroi*不同化甲基-D-吡喃葡萄糖苷。马金黑棘孢对放线菌酮敏感且能同化D-木糖[11]。

(三)分子生物学鉴定

有些真菌（灰色限球壳，足菌肿马杜拉菌，马金黑棘孢和*M. romeroi*）不易形成孢子，但可使用分子生物学方法对其进行鉴定[16,101]。Borman及其同事开发出了一种针对黑粒足菌肿病原体的快速鉴定方法，该方法是基于ITS区rRNA的测序数据设计的[102]。黑色酵母甄氏外瓶霉[50]、足菌肿马杜拉菌[15]、新月弯孢霉、*M. romeroi*、马金黑棘孢[103]及暗色枝顶孢属的病原体可通过同一标记进行鉴定[104-105]。Wedde等[101]的研究也开发出rRNA ITS序列特异性引物，用于鉴定赛多孢霉属的真菌。同种真菌不同菌株间有较大差异时，相对稳定的基因组区域，如26S rRNA操纵子[106]，有望用于该真菌尖端赛多孢霉样基因型的测定。近期，Lu等[107]针对6个与尖端赛多孢霉复合群近缘真菌的鉴定，发展并评估了以β微管蛋白部分编码基因为检测靶位的3种分子生物学技术，分别为实时定量PCR法、基于PCR的反向线性杂交技术和环介导等温扩增法。β微管蛋白基因限制性片段长度多态性和基于ITS的滚环扩增技术、环介导等温扩增技术和重组聚合酶扩增技术也被用于足菌肿马杜拉菌[89-90]、热带马杜拉菌（*M. tropicana*）[90]、塞内加尔镰孢菌[90]、汤普金镰孢菌[90]、*M. romeroi*[90]、灰色限球壳[90]和尖端赛多孢霉复合群的鉴定[108-109]。

八、分型

近年，在很多真菌属种中都建立了分子分型技术，包括可以引起足菌肿的真菌。许多技术不仅在基因分型方面有意义，在准确鉴定物种方面也发挥作用[16]。基因分型可区分环境株和临床分离株间的差异，是了解环境中真菌分布和感染源的重要工具。Harun等[110]总结了赛多孢霉属基因分型的方法。Sande等在通过扩增片段长度多态性的研究中，揭示了马杜拉菌属的不同克隆在毒力和地理分布上的差异[111]。根据尖端赛多孢霉的高度遗传异质性，已在种群水平上准确地确定了该菌亚种的分型。Rainer等[112]发现，通过M-13指纹识别技术分析的菌株都属于不同的基因型，某些基因型可从同一采样点重复获得。Zouhair等[113]利用菌株的高度多态性，使用多位点酶电泳分析和随机扩增多态性DNA技术监测了囊性纤维化患者肺部定植的菌株，发现了菌株从肺向皮肤播散的特点。Defortaine等[114]追踪了9个囊性纤维化患者，发现每个患者携带的菌株基因型都不同。

九、血清学试验

目前，尚无任何一种足菌肿致病真菌商品化的抗原或抗体测定方法。在某些地方性足菌肿流行区域有在使用自制的抗体检测方法[115-118]。因缺乏抗原制备的标准化手段，特异性和敏感性不佳，使这些检测方法的临床应用受到限制。在这些地方性的抗体检测方法中，利用真菌菌丝粗提抗原进行的免疫扩散和对流免疫电泳（counter immunoelectrophoresis，CIE）技术最常用[119]。用免疫扩散法可区分足菌肿马杜拉菌感染的真菌性足菌肿和放线菌足菌肿[116]。流行地区之外的健康人血清不能和足菌肿马杜拉菌抗原反应。但将抗原常规应用于足菌肿患者的诊断时，常在确诊病例中出现假阴性，从而影响了诊断的敏感性[116,119]。当使用同一种抗原时，对流免疫电泳更敏感，能检测出比免疫扩散更低的足菌肿马杜拉菌抗体含量[120]。

除了这2种方法之外，还开发了一些ELISA

方法，其中所用抗原为全真菌胞浆提取物或重组蛋白，例如足菌肿马杜拉菌翻译控制肿瘤蛋白、果糖二磷酸醛缩酶或丙酮酸激酶等[98, 121-123]。大多数ELISA检测方法不能把健康人和患者明显区别开来[121-123]。另外足菌肿马杜拉菌感染患者的血清也与波氏赛多孢霉的抗原有交叉反应[123]。只有Wethered等[118]建立的检测足菌肿马杜拉菌胞浆抗原IgM型抗体的ELISA技术可以将健康人和患者进行有效区分，但后来，Zaini等[123]用这个方法检测时却无法重复出上述结果。曾使用3种足菌肿马杜拉菌的重组抗原，但因明显的交叉反应，也未获得可靠的ELISA结果[121-122]。最近，从足菌肿马杜拉菌的胞浆提取物中鉴定到3个具有高特异性的免疫显性蛋白，分别为45 kDa、60 kDa和95 kDa[115]；这个研究在苏丹100例患者中完成，但其临床应用仍有待进一步评估[115]。以上这些血清学方法中，对流免疫电泳一度被认为是最可靠的方法，在苏丹喀土穆足菌肿研究中心作为常规检查应用多年，直到抗原制备的重复性出现问题后才停止应用。

十、抗菌药物敏感性试验

对于大多数真菌引起的真菌足菌肿来说，抗菌药物敏感性的试验数据较少。但对于足菌肿马杜拉菌、尖端赛多孢霉和甄氏外瓶霉等，已收集了一定数量菌株的药敏数据。

除了尖端赛多孢霉和镰刀菌属外，大多数引起足菌肿的真菌在体外对酮康唑、伊曲康唑、伏立康唑和泊沙康唑敏感。然而这些药物的体外抗真菌活性与临床治疗效果差异较大[50, 124-129]。酮康唑和伊曲康唑是治疗足菌肿的常用药物，但临床治疗效果较差[124-125, 130-131]。新一代三唑类药物（如伏立康唑和泊沙康唑）具有较好的体外和体内抗真菌效果[125]，但也出现过治疗失败的案例，特别是伏立康唑治疗时[129]。如表128-3所示，大多数引起足菌肿的真菌对两性霉素B、氟康唑、特比萘芬、5-氟胞嘧啶、卡泊芬净、阿尼芬净和米卡芬净都有较高的最低抑菌浓度（minimum inhibitory concentration，MIC），而对唑类的MIC较低，尤其对泊沙康唑的MIC最低。但不同真菌对不同唑类的敏感性存在差异（表128-3），因此，准确的种属鉴定对于合理选择抗真菌药物是尤为重要的。

目前，真菌的体外药敏试验数据与临床结果之间还存在较大差距，迄今为止仅有3项研究使用了动物实验评价抗真菌药对足菌肿致病真菌的作用效果，这3项研究用的都是足菌肿马杜拉菌作为致病真菌。其中2个研究用的动物模型是无脊椎动物大蜡螟[132]，第3个研究使用了小鼠模型。在这3项研究中，体外药敏试验的结果显示，足菌肿马杜拉菌对唑类抗真菌药高度敏感，但在体内治疗中，酮康唑[132]、伊曲康唑[132-134]、伏立康唑[132]和泊沙康唑[132]效果都不理想；而具有较高MIC的两性霉素B和特比萘芬，在大蜡螟幼虫[132-133]和小鼠[134]中表现一定的治疗效果。两性霉素B、特比萘芬或伊曲康唑联合应用在大蜡螟幼虫中则显示拮抗作用[133]。

在临床处置和预后方面，放线菌足菌肿与真菌性足菌肿有所不同。对于放线菌足菌肿，普通的抗菌治疗就可获得较高的治愈率，而真菌性足菌肿需联合抗真菌治疗和外科手术，且临床治疗效果有限。目前，针对患者抗真菌治疗效果的研究数量有限，更缺乏不同抗真菌药治疗效果的比较研究。第一项针对伊曲康唑和磷雷夫康唑（fosravuconazole）的大型临床研究始于2017年，目前还未获得相关的研究数据[135]。尽管如此，人们仍可以从这些为数不多的研究报道中得出一些结论。在13例由足菌肿马杜拉菌引起的足菌肿患者中，使用酮康唑治疗有5例治愈[130]，而使用伊曲康唑治疗只有1例治愈[131]。目前，酮康唑已不是批准的真菌病治疗用药，推荐用药是伊曲康唑[136-137]。虽然伊曲康唑的治愈率不尽如人意，但所有接受规范治疗的患者，病情均出现好转或得到稳定控制。使用新一代唑类如泊沙康唑则获得了较好的疗效[138]。Negroni等[138]使用泊沙康唑治疗了6例足菌肿患者，4例患者痊愈，另外2例患者临床改善或病情得到控制。唯一得到临床研究评价的用于足菌肿治疗的非唑类药物是特比萘芬。在N'diaye等[139]的研究中，使用特比萘芬治疗的20例患者，4例痊愈，12例临床改善，4例无效。根据目前有限的观察结果和表128-3总结的体外研究数据，泊沙康唑有望成为治疗足菌肿的理想药物，但仍需要进一步合理设计临床试验进行验证。

表 128-3 真菌性足菌肿致病真菌的体外药物敏感性

抗菌药物	足菌肿马杜拉菌 *Madurella mycetomatis*[1]		灰色限球壳 *Trematosphaeria grisea*[2]		波氏赛多孢霉 *Scedosporium boydii*[3]		塞内加尔镰孢菌 *Falciformispora senegalensis*[4]		*Medicopsis romeroi*[5]		甄氏外瓶霉 *Exophiala jeanselmei*[6]	
	MIC_{50}（MIC 范围）	菌株数	MIC_{50}（MIC 范围）	菌株数	MIC_{50}（MIC 范围）	菌株数	MIC_{50}（MIC 范围）	菌株数	MIC_{50}（MIC 范围）	菌株数	MIC_{50}（MIC 范围）	菌株数
两性霉素 B	0.5 (<0.016~4)	34	8 (2~>16)	3	1 (0.25~2)	21	2 (2)	4	0.125 (0.125)	5	1 (0.25~2)	9
酮康唑	0.06 (<0.03~4)	38	1 (0.125~8)	11			0.5 (0.5~1)	4	8 (0.125~8)	7	1 (1~8)	2
伊曲康唑	0.03 (<0.03~0.5)	38	0.5 (0.03~4)	11	0.25(<0.03~4)	21	0.125 (0.125~0.25)	4	16 (0.125~>16)	7	0.125 (0.03~0.25)	11
泊沙康唑	<0.03 (<0.03~0.125)	34	0.03 (0.03~0.25)	3	0.5 (ND[2])	30	0.06 (0.06~0.25)	4	0.5 (0.25~1)	5	0.03 (0.016~0.063)	9
氟康唑	4 (0.25~>128)	34	64 (16~64)	3	16 (8~32)	21	64 (64~128)	4	>256 (>256)	5	16 (8~32)	9
伏立康唑	0.06 (<0.016~1)	34	0.25 (0.25~0.5)	3			0.25 (0.25~0.5)	4	0.125 (0.125~0.25)	5	1 (0.25~2)	9
艾沙康唑	0.03 (<0.016~0.25)	22									ND	
雷夫康唑	0.004 (0.002~0.03)	23										
特比萘芬	8 (1~>16)	34									ND	
5-氟胞嘧啶	>64 (>64)	34	64 (16~>64)	3			32 (8~32)	4	8 (8~32)	5	ND	
卡泊芬净	64 (16~>128)	17	>16 (8~>16)	3			16 (16~>16)	4	>16 (16~>16)	5	4 (2~8)	9
阿尼芬净	>128 (0.5~>128)	17									0.5 (0.063~4)	9
米卡分净	>28 (8~>128)	17									ND	

注：表中 MIC 单位为 μg/ml；ND. 无数据。[1] 见参考文献[127][140][185-190]。[2] 见参考文献[191]和[192]。[3] 见参考文献[193]和[194]。[4] 见参考文献[192]。[5] 见参考文献[191]和[192]。[6] 见参考文献[190]

在足菌肿治疗新药的研发中，目前正在大规模临床试验中评估磷雷夫康唑的治疗效果[135]。作为雷夫康唑的前体药，磷雷夫康唑显示了对足菌肿马杜拉菌较高的体外抗真菌活性[140]。

十一、结果的评价、解读和报告

由于足菌肿的致病真菌在土壤或植物中腐生，确诊后必须谨慎地评估它们在致病过程中所起的作用。组织中发现沿瘘管排出的真菌颗粒为确诊依据。颗粒可能附着在瘘管处的纱布敷料上。肉眼观察即可识别脓汁、分泌液或活检材料中存在的真菌颗粒。通过颗粒的颜色、内部结构、大小和形状可直观地判定材料中有无可能的致病真菌。

把颗粒压碎后进行革兰染色，可进一步区分放线菌足菌肿与真菌足菌肿。放线菌的颗粒为球形或杆状，由革兰阳性、直径 0.5～1.0 μm 的细丝交织混杂组成。而真菌颗粒是由更宽的、直径 2～5 μm 的有隔菌丝交织组成，并含有许多非正常形状、肿胀的细胞，细胞直径可达 15 μm，尤其是颗粒周围，这种现象更为明显。很多真菌颗粒被胶状物质所包绕。

尽管肉眼和镜下的感染病灶颗粒特点能帮助人们鉴定真菌及其种群类别[141]，但明确的病原学诊断仍依赖于从不同颗粒中分离出同一种真菌。临床微生物实验室应避免对患者样本做出诸如“黑粒足菌肿”或“灰粒足菌肿”这样的检测报告，应尽量进行真菌的分离和鉴定。对培养的结果应仔细评估，尤其是发现有新的或不常见的快速生长的菌种时更应重视，因为这些真菌很可能是在样本收集和分离时污染而来。另一方面，临床医生应避免仅根据感染颗粒形态制定治疗方案，应耐心等待实验室真菌分离和鉴定结果再做定夺。

参考文献请扫二维码查阅

第129章　真菌毒素

JOANNA TANNOUS，NANCY P. KELLER

（李轶　译；廖康、陆玲　审校）

真菌毒素是对人类和动物具有不良影响的广泛存在的多种真菌产生的次级代谢物。次级代谢产物（secondary metabolites，SMs）又称天然产物，它不是真菌在实验室环境中生长的必需物质，但在真菌繁殖过程中可以起到保护性作用。这些作用包括防止其他微生物入侵和保护自身安全[1-2]。目前的资料表明，SMs在微生物信息传递中起着至关重要的作用。最新研究发现，真菌通过与其他微生物相互作用来激活沉默基因簇表达从而可以诱导新的SMs产生[3-5]。近几年，有报道认为部分SMs是真菌-植物相互作用和真菌感染动物的毒力因子[6-8]。因此，许多SMs是具有生物活性的，人和动物摄入这些产物后会造成机体损伤。真菌产生的有毒成分并不都是真菌毒素，例如，酵母和蘑菇产生的毒素并不属于真菌毒素范畴。对细菌有抑制作用的化合物被称为抗生素，对植物有毒性作用的则被称为植物毒素[9]。目前，已经发现了500多种不同的真菌毒素[10]，并且随着现代质谱分析和代谢组学的应用，这一数字还在不断增加[11-12]。本章将介绍最常见的真菌毒素及其与病态建筑综合征（sick building syndrome，SBS）、生物恐怖及食品安全的相关性。由于其他章节中已有相关详细描述，本章节没有讲述真菌毒素对健康、医疗费用和医疗经济的影响[13-16]。读者可以参考最近的关于真菌毒素的综述[9，17-19]。

一、真菌毒素的生物合成和化学分类

绝大多数真菌毒素及所有真菌次级代谢产物都是来自熟知的化学前体。如脂肪酸类的聚酮化合物，由酰基辅酶A（acyl-CoA）合成，非核糖体多肽由氨基酸构成，以及生物碱和萜烯分别由异戊烯化芳香族氨基酸和异戊二烯衍化生成。图129-1列出了一些常见真菌毒素的化学分类和结构，表129-1列出了产生这些毒素的真菌。在以上引用的生物合成类别中，源自乙酸酯代谢的聚酮化合物化学类别似乎占主导地位[20]。值得一提的是，在图129-1所示的九类霉菌毒素中，只有单端孢霉烯族毒素（萜烯）和麦角生物碱（非核糖体肽和烯丙基色氨酸）不属于聚酮化合物族。但一些较不常见的真菌毒素仅来自萜烯或非核糖体肽/生物碱来源。

虽然人们对于最常见真菌毒素的化学结构和生化特征的了解要早于其遗传学特性。在过去十年中人们已经发现了许多常见真菌毒素合成所需酶的编码基因[17]。最近，已开发出一种可扩展的平台来识别新型真菌SMs，并将其归类到相应的生物合成基因簇[21]。例如，最早发现的真菌毒素基因簇是在黄曲霉（*Aspergillus flavus*）和寄生曲霉（*Aspergillus parasiticus*）中的黄曲霉素编码基因簇[22-23]及构巢曲霉（*Aspergillus nidulans*）中的杂色曲霉编码基因簇[24]。研究发现，这些基因成簇存在于单一基因位点，为真菌次级代谢产物的标志[20]。代谢相关基因的物理性聚集对其调控有显著影响[25]。其中，必须要提的是，编码真菌毒素生物合成的基因簇经常（但非必需）含有转录因子，该转录因子可特异性调节簇中其余基因的表达。真菌次级代谢产物的分子遗传学研究已成为新近研究热点[25-27]。图129-2总结了笔者目前对本章所述真菌毒素基因簇的理解。

（一）黄曲霉素

黄曲霉素是研究最早、也是研究最为清楚的一类真菌毒素。根据在紫外线下显示蓝色或绿色

表 129-1 产真菌毒素真菌的简单分类[180]

真菌毒素分类	属	代表性种
黄曲霉毒素	曲霉菌属 青霉菌属	*A. fumigatus*, *A. flavus*, *A. Parasiticus*, *P. aurantiogriseum*
桔霉素	青霉菌属	*P. citrinin*, *P. expansum*
环匹阿尼酸	曲霉菌属 青霉菌属	*P. griseofulvum*, *A. flavus*
麦角生物碱	曲霉菌属 瘤座菌属 麦角菌属 稻香柱菌 内生真菌	*A. fumigatus*, *C. purpurea*
伏马毒素	赤霉菌属 镰刀菌属	*G. fuyikuroi*, *F φroliferatum*
赭曲霉毒素	曲霉菌属 青霉菌属	*A. ochraceus*, *P. verrucosum*
棒曲霉素	青霉菌属 拟青霉属 青霉菌属	*A. clavatus*, *Paecilomyces fulvus*, *Paecilomyces niveus*, *P. grisefulvum*, *P. expansum*
单端孢霉烯族毒素	葡萄穗霉属	*S. chartarum*
玉米赤霉烯酮	赤霉菌属 镰刀菌属	*F. crookwellense*, *F. culmorum*, *G. zeae*, *F. incarnatum*

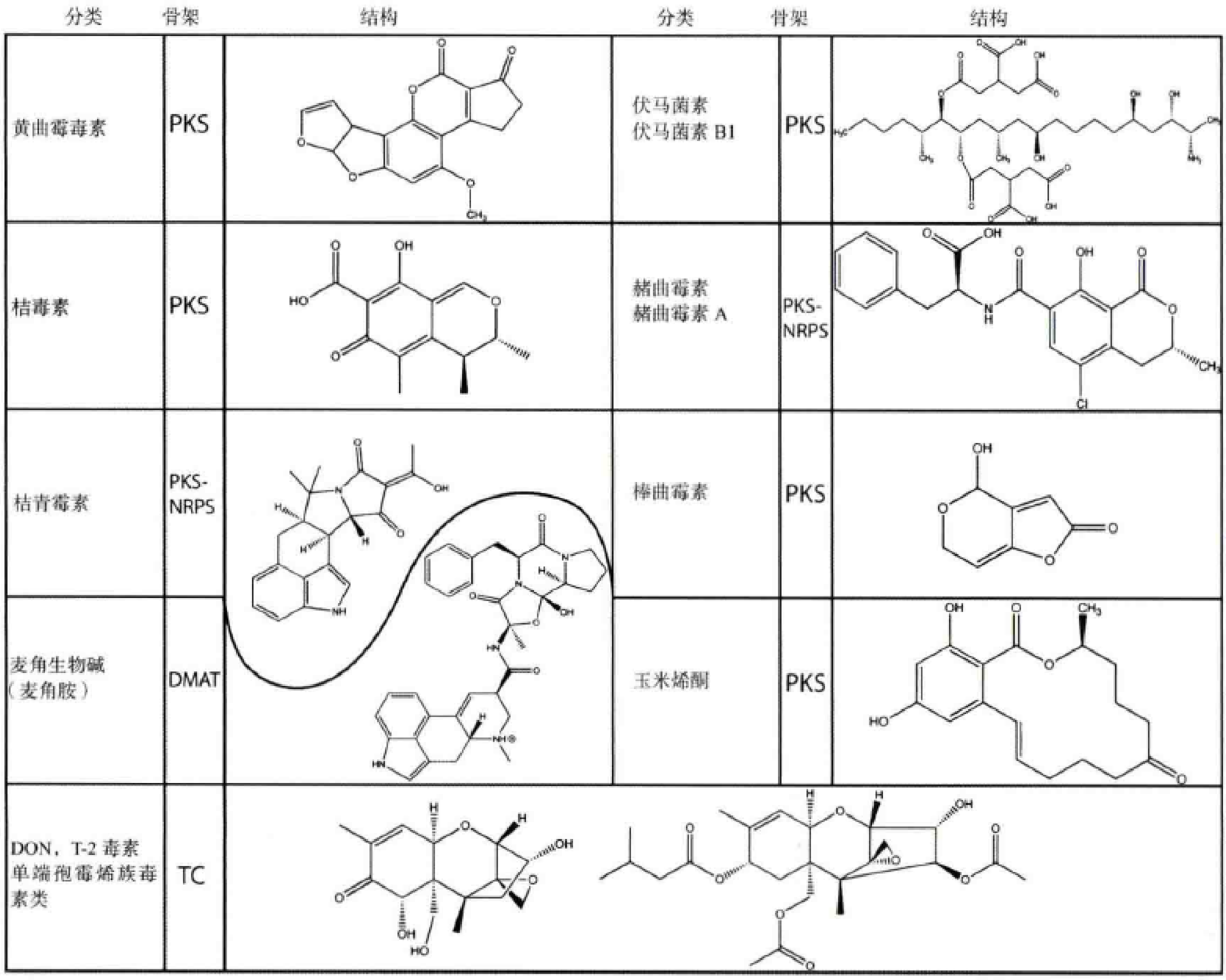


图 129-1 真菌毒素分类，生物合成的关键酶、各种毒素的化学结构。PKS. 聚酮合成酶；NRPS. 非核糖体肽合成酶；DMAT. 二甲基烯丙基色氨酸合成酶；TC. 萜烯环化酶；DON. 呕吐毒素[9]
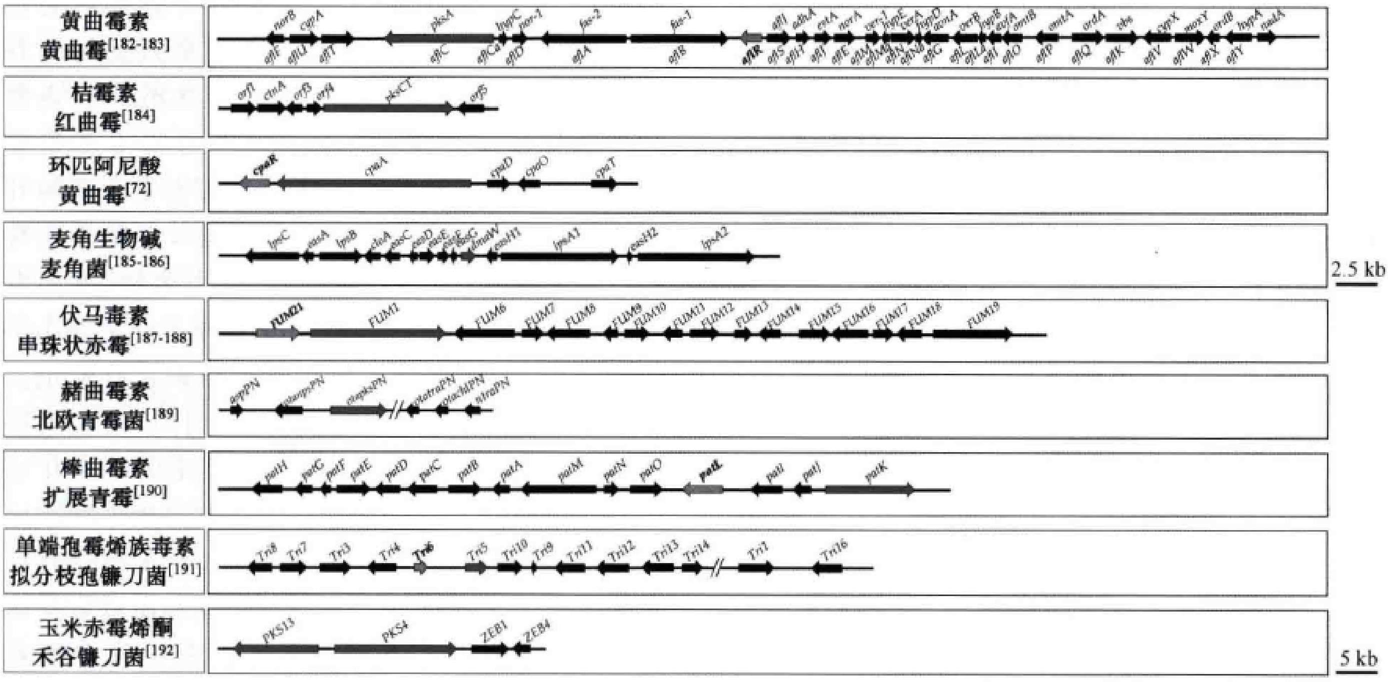


图 129-2　不同真菌毒素的主要基因决定族结构。主链基因用蓝色表示，特定转录因子用灰色表示。每个基因的转录方向以箭头表示，上方是该基因的名称。在黄曲霉毒素途径基因簇中，旧基因名称标记在该行的顶部，新基因名称标记在该行的下方。对角二等分表示该基因族不是连续的。2.5 kb 比例尺适用于麦角生物碱簇，5kb 比例尺适用于除麦角生物碱簇以外的所有簇，见彩插

荧光的不同（蓝色或绿色荧光）[28]，将黄曲霉素（图 129-1）分为黄曲霉素 B_1、B_2、G_1 和 G_2；其中黄曲霉素 B_1 是已知最强的天然致癌物[29]。目前，已有不少综述阐明了黄曲霉素及能够产该毒素的真菌[30]。

黄曲霉素可由多种曲霉菌产生，特别是黄曲霉和寄生曲霉。黄曲霉是农产品包括谷物、大米、无花果、坚果和烟草最常见的污染菌[31-32]。农作物的污染可能发生在收割之前，干旱季节最为常见[32-33]，或是储存期间，是否污染取决于农作物含水率和储存环境湿度[31,34]。黄曲霉素污染主要发生于热带和亚热带气候的国家，那里的温度和湿度条件最适合真菌生长和毒素产生[35]。然而，它的危险已经超出了预期的地理界限，并已蔓延到以前被认为相对安全的国家[36]。黄曲霉素污染可能是造成各种经济和健康问题的原因，在发展中国家问题尤其严重[37]。例如，当谷物中存在黄曲霉素时则可显著降低谷物作为粮食或出口商品的价值，因为这种毒素与农场动物死亡率的增加有关[38]。此外，奶牛摄入黄曲霉素可导致牛奶中存在 B_1 羟基化形式的黄曲霉素 M_1[39]。

不同脊椎动物对黄曲霉素的易感性有很大差异。1960 年首次报道了黄曲霉素的毒性效应，黄曲霉素污染的饲料导致超过 10 万只火鸡暴发死亡，该事件被称为“火鸡 X 病”[40]。发生在鸭和鸡[41]、猪[42]和小牛[43]中的暴发死亡也有报道，主要原因是使用了被污染的巴西花生作为饲料。2004 年肯尼亚暴发了最为严重的人类急性黄曲霉素中毒事件[44]，随后在 2005 年 和 2006 年发生规模较小但影响重大的中毒事件[45]。上述暴发的事件表明了监控和限制食品中真菌毒素含量的必要性，但在发展中国家很难做到。而在美国和其他发达国家中，经常出现宠物食品（尤其是犬粮）的黄曲霉素污染[46]。许多论文回顾了世界范围内的黄曲霉素对食物和饲料的污染[47-49]及黄曲霉素管理技术的最新进展[50]。

（二）桔霉素

桔霉素（图 129-1）是一种简单的能以柠檬色针状结晶形式存在的低分子量化合物。在发现其真菌毒素效应前[51]一直认为它是可用于治疗溃疡的抗生素。最常见产生桔霉素的微生物包括桔青霉（*P. citrinum*）、扩展青霉（*P. expansum*）、黄灰青霉（*P. aurantiogriseum*）和卡门伯特青霉（*P. cam-*

emberti，用于生产奶酪）、新雪白曲霉（*Aspergillus neoniveu*）和米曲霉（*Aspergillus oryzae*）（用于生产清酒和酱油）、土曲霉（*Aspergillus terreus*）和红曲属（*Monascus* spp.，用于生产红色食品染料）[52]。

桔霉素最初是从日本水稻黄叶病相关的桔青霉（*P.citrinum*）分离得到[53]。之后在各种谷物、花生和水果中也发现了桔霉素，但证明桔霉素在谷类制品中持续存在的证据有限[9]。桔霉素产生菌也产生其他真菌毒素，包括赭曲霉素、黄曲霉素和棒曲霉素。因此，有文献报道在水稻[54]和苹果[55]中桔霉素与这些真菌代谢产物共存。动物实验结果表明，桔霉素有肾毒性[56]，可抑制大鼠肾、肝和脑组织中的脱氢酶活性[57]。还有报道桔霉素对哺乳动物生殖系统有毒性作用，特别是对卵母细胞成熟有毒性作用[58-60]。但桔霉素是否损害人类健康尚不明确，目前还没有人类桔霉素中毒的报道。

(三)环匹阿尼酸

环匹阿尼酸（cyclopiazonic acid，CPA）（图 129-1）是由部分青霉菌属和曲霉菌属产生的一种吲哚四胺酸毒素[61-62]。研究表明环匹阿尼酸对所有测试的实验动物（包括大鼠[63]、鸡[64]、犬[65]和猪[66]）都有强毒性。凭借其细胞毒性，CPA 被认为是黄曲霉入侵植物细胞的潜在致病因素[67]。CPA 污染的各种食品（包括谷物、肉类和奶酪），有时会同时存在黄曲霉素的污染[68]。由此推测，“火鸡 X 病”的某些症状可能是由黄曲霉素和 CPA 共同引起的[69]。

黄曲霉基因组中存在编码 CPA 的基因簇，而在黄曲霉的近亲属米曲霉基因组上的 CPA 编码基因簇是截短的[70]，并且米曲霉中黄曲霉素编码基因簇截短或突变的现象经常出现[71]。米曲霉常用于米制品的发酵，由于其黄曲霉素基因簇上关键基因的缺失导致其不能生成 CPA。虽然一些米曲霉中含有这些关键基因，但是由于其具有某些黄曲霉没有的酶类，可以把米曲霉合成的 CPA 转化为毒性较低的化合物 2-氧代 CPA[72]。目前，CPA 对人类的毒性尚不明确，认为它可能会损伤心脏[73]和肝，引起“kodo 中毒”[74]。

(四)麦角生物碱

麦角生物碱由黑麦麦角菌（*Claviceps purpurea*）产生，可导致麦角中毒症或圣安东尼热（St. Anthony's fire），表现为患者摄入受污染谷物，特别是黑麦后出现坏疽或痉挛状态[75]。麦角生物碱主要有两类：麦角酸衍生物和棒麦角素（clavines），两者都是从四环麦角碱衍生而来的吲哚生物碱。与所有麦角生物碱一样，麦角酸经常可以生成氨基化合物、氨基酸、肽衍生物，例如麦碱，麦角新碱，麦角酰二乙胺（lysergic acid derivatives，LSD）和麦角缬氨酸。棒麦角素含有麦角灵结构，但不含有氨基酸或肽成分，例如，培高利特和麦角乙脲[75]。麦角酸衍生物研究从最初开始（如著名的迷幻剂 LSD[76]），半合成麦角生物碱已历经了几十年的研究发展。最近人们正在研究麦角生物碱的抗癌潜力[77]及对血清素和血清素受体的影响[78-79]。图 129-1 列出了代表性化合物麦角胺。

曲霉菌属、瘤座菌属（*Balansia*）、麦角菌属、*Epichloë* 菌和内生真菌（*Neotyphodium*）菌属均可合成麦角生物碱。研究表明，烟曲霉（*A. fumigatus*）可以合成烟曲棒麦角素 A、B、C 和羊茅麦角碱。羊茅麦角碱最初在黑麦麦角菌中被发现，而后在内生真菌中也存在此碱[80]。现代化谷物清洗方法几乎全部消除了麦角生物碱对人类食物链的威胁。麦角中毒在兽医领域仍是值得关注的问题，牛、羊、猪和鸡都可出现由其中毒引起的类似人类中毒出现的坏疽、抽搐和流产症状[81]。

(五)伏马毒素

伏马毒素（图 129-1）是新近发现的真菌毒素。20 世纪 70 年代末和 80 年代初，马脑白质软化症[82]和大鼠肝癌[83]已被证实是由藤仓赤霉菌（*Gibberella fujikuroi*）产生的伏马毒素引起。截至 2002 年，共发现有 28 种伏马菌素类似物，它们被分为 A、B、C 和 P 组[84]。层生镰刀菌（*Fusarium proliferatum*）、赤霉菌 *Gibberella nygamai*、黑曲霉（*Aspergillus niger*）和互格交链链格孢（*Alternaria alternata*）也可产生这些真菌毒素[85-86]。

除了上述症状，伏马毒素还可引起猪肺水肿和胸腔积液[87]。此外，许多关于该毒素急性暴露的研究是伏马毒素对猪肠道的影响，并且已有综述报道[88]。藤仓赤霉菌是合成伏马菌素的主要真

菌，在不同的条件下该菌可以引起植物枯萎和腐烂[89]，因而它对谷物的产量有着重要的影响。此外，大量研究表明伏马菌素可引起多种人类疾病，特别是食管癌[90]。正因如此，国际监测系统已经开始关注这种代谢物[91]，但很不幸的是，食品和饲料中该毒素与黄曲霉素常同时被发现[92]。Wang等[93]的最新综述是任何对伏马菌毒素毒性感兴趣的人必读的文献。

(六)赭曲霉毒素

赭曲霉毒素 A 和 B 由疣状青霉(*Penicillium verrucosum*)和曲霉属(*Aspergillus* spp.)产生[特别是赭曲霉(*A. ochraceus*)](图 129-1)。这类毒素有致癌性，免疫抑制性和肾毒性[38,94]。赭曲霉毒素 A 于 1965 年首次被发现其对动物有毒性作用[95]，而且其较赭曲霉毒素 B 更为常见，并在肝中通过细胞色素 P450 代谢[96]。赭曲霉毒素最常污染大麦，也可以污染燕麦、黑麦、小麦和咖啡豆[9,95,97]。赭曲霉毒素可以通过食物链传播(特别是在牛奶和猪肉[98])，因此日益受到研究人员的关注。在斯堪的纳维亚半岛尤其如丹麦的国家中，猪肾病的发生率很高，被认为与饲料中赭曲霉毒素 A 污染率较高有关[99]。除谷物外，葡萄酒是人类暴露于曲霉毒素 A 的另一最大来源，原因是葡萄园中的葡萄容易受到曲霉属真菌的污染[100]。此外，一些研究推测赭曲霉毒素 A 还可能导致帕金森病的发生[101]。

(七)棒曲霉素

20 世纪 40 年代，首次从灰黄青霉(*Penicillium griseofulvum*)中分离出棒曲霉素(图 129-1)，因其具有抗菌活性而被大量生产[102]。但在 20 世纪 60 年代，人们发现棒曲霉素对植物和动物也有毒性作用后，它们被重新列为真菌毒素[9]。文献描述了不同动物棒曲霉素急性中毒的症状，例如呕血，腹泻，嗜睡，呼吸急促，大面积肺不张和肺泡出血[103-105]。目前尚无人类急性毒性案例的报道。慢性暴露于棒曲霉素同样也具有多种毒性作用，主要是细胞毒性和遗传毒性[106-108]。棒曲霉素通常可在被扩展青霉污染的水果产生的未发酵果汁中检出[109]，但有报道其直接生物合成的前体天冬醇存在于酒精饮料(主要是苹果酒)[110]。在体外试验已证实高浓度的棒曲霉素具有毒性，但尚未有棒曲霉素引起人类中毒的报道[9]。由于棒曲霉素常在苹果汁和儿童食品饮料中检出，一些国家严格限制了其在某些食品和饮料中的含量[111]。近年来，许多论文[112-113]报道棒曲霉素在苹果感染中作为毒性因子的潜在作用。读者可以参考近期关于棒曲霉素生物合成和毒性的综述[114-115]。

(八)单端孢霉烯族毒素

单端孢霉烯族毒素是镰刀菌属(*Fusarium*)、漆斑菌属(*Myrothecium*)、拟茎点霉属(*Phomopsis*)、葡萄穗霉属(*Stachybotrys*)、木霉属(*Trichoderma*)和单端孢属(*Trichothecium* spp.)等的次级代谢产物。最常见和被研究较多的镰刀菌单端孢霉烯族毒素(图 129-1)有 T-2 毒素、HT-2 毒素、二乙酰镳草镰刀菌烯醇、瓜蒌镰菌醇和脱氧萎镰菌醇(又称 DON 毒素或呕吐毒素)。DON 毒素是粮食中最为常见的真菌毒素之一，在大麦、燕麦、黑麦和小麦中均可出现。当牲畜大量摄入该毒素时，可引起恶心、呕吐和腹泻。当摄入量少时可导致动物体重减轻和厌食[116]。体外研究表明 DON 毒素还可以抑制牛和猪的中性粒细胞功能[117]。纸葡萄穗霉(*Stachybotrys chartarum*)可合成多种单端孢霉烯族毒素，包括疣孢霉素 B 和 J、漆斑菌素 E、葡萄穗霉毒素 F、G 和 H 及异曲霉素 F、G 和 H[118-119]。最初认为葡萄穗霉属污染稻草是导致一种高度致命性马疾病的病因[120]，但最近发现，葡萄穗霉属是导致 SBS 病症的一个危险因素。Pinton 和 Oswald[121]对有关 DON 和其他单端孢霉烯族毒素的毒性进行了详尽的综述。

(九)玉米赤霉烯酮

玉米赤霉烯酮(图 129-1)是由赤霉菌属(*Gibberella*，如 *G. pulicaris* 和 *G. tricincta*)产生的非甾体类雌激素或植物雌激素[122]。玉米赤霉烯酮是谷类作物的常见污染物，可导致动物食用发霉玉米和谷物后产生过量的雌激素[123]。雌激素过高导致的疾病包括子宫和乳头肿大、阴道脱垂和不孕[124]。近期玉米赤霉烯酮被证明具有免疫毒性，可导致胸腺萎缩伴组织学和胸腺细胞表型改变，同时脾脏 B 细胞百分比降低[125]。另外，目前已报道了多次猪玉米赤霉烯酮中毒引发的流行暴发[126]。许多最新研究表明，玉米赤霉烯酮可诱导活性氧的生成、脂质过氧化、DNA 氧化损伤和细

胞凋亡[127-128]，并提示氧化应激似乎是其体内和体外毒性的关键决定因素。最近抗氧化剂酚类化合物白藜芦醇对玉米赤霉烯酮诱导的细胞损伤被证明具有显著的保护作用[129]。

二、食品安全

食用霉变食物是引起人类和牲畜真菌毒素中毒的主要原因。真菌毒素污染可以发生在粮食作物储存和运输的任何环节。粮食的真菌毒素污染会造成巨大的经济损失。与人工合成污染物、植物毒素、食品添加剂和农药残留相比，粮食的真菌毒素污染造成的膳食风险更高、更持久[130]。

表 129-1 和表 129-2 列出了本章讨论的真菌毒素和常见的粮食污染种类。备注：2 个表都不全面，其他真菌或物质也可产生真菌毒素。

表 129-2　真菌毒素及其常见粮食污染种类[181]

真菌毒素分类	大麦	奶酪	咖啡豆	玉米	水果	燕麦	花生	大米	黑麦	小麦
黄曲霉素				×			×	×		×
桔霉素	×			×		×		×	×	×
环匹阿尼酸		×		×			×			
麦角生物碱	×					×			×	×
伏马毒素				×						
赭曲霉素	×		×						×	×
棒曲霉素					×					
单端孢霉烯族毒素				×						
玉米赤霉烯酮				×						

(一)管理

考虑到防止真菌毒素污染的困难及这些有毒物质对人类和动物健康的影响，许多国家颁布了食品和动物饲料中真菌毒素水平的法规。真菌毒素法规最早是由美国在 60 年代后期制定，随后美国 FDA 实施的《联邦食品、药物和化妆品法》设定了新的限制和规定。后者已经确定了黄曲霉素的特定"作用"水平和其他类别真菌毒素的"建议"水平[131]。欧盟也是最早制定统一的食品和饲料真菌毒素法规和限量的国家之一[132]。各国限制真菌毒素的法规指南有所不同，联合国粮食及农业组织出版的药典和近期的文献综述进行了总结[111,133]。表 129-3 总结了主要的真菌毒素、它们的主要毒性作用和毒理学参考值。

表 129-3　主要真菌毒素：病理影响和毒理学参考值[131-132,182-183]a

真菌毒素分类	证明或怀疑病理影响	食品和饲料的既定监管水平(PPB)		每千克体重每日最大可容忍摄人量(JECFA)
		欧盟	美国(FDA)	
黄曲霉素	肝毒性 致癌作用 造血效应 基因毒性 免疫毒性 致畸作用	B1：0.10～12 B1＋B2＋G1＋G2：4～15 M1：0.025～0.050	B1＋B2＋G1＋G2：20 M1：0.5（干预值）	尽可能低剂量原则[b]
桔霉素	肾毒性 细胞毒性 免疫毒性 生殖毒性 基因毒性	NR	NR	—

（续 表）

真菌毒素分类	证明或怀疑病理影响	食品和饲料的既定监管水平(PPB)		每千克体重每日最大可容忍摄入量(JECFA)
		欧盟	美国(FDA)	
环匹阿尼酸	坏死效应 致癌性 神经毒性	NR	NR	—
麦角生物碱	消化系统紊乱 痉挛 流产	NR	NR	—
伏马毒素	致癌性 基因毒性 肝毒性 免疫毒性 肾毒性 生殖毒性	200～4000	2000～4000(指导值)	2 mg/(kg·d)
赭曲霉素	肾毒性 肝毒性 免疫毒性 神经毒性 致畸性 致癌性	0.2～80	NR	0.005/0.0143 mg/(kg·d)
棒曲霉素	细胞毒性 基因毒性 免疫毒性 生殖毒性 致畸性	25～50	50(干预值)	0.4 mg/(kg·d)
单端孢霉烯族毒素(DON)	造血效应 基因毒性 神经毒性 肾毒性 雌激素效应	200～1750	1000～10000(指导值)	1 mg/(kg·d)
玉米赤霉烯酮	免疫毒性 生殖毒性 致畸性	20～400	NR	0.2/0.5 mg/(kg·d)

注：[a] NR. 不受管制。[b] 黄曲霉毒素在没有阈值的情况下表现出致癌和遗传毒性作用，唯一现实的方法是在不破坏食物基质的情况下尽量减少暴露，遵循尽可能低剂量(ALARA)原则

(二)毒素检测

由于真菌毒素广泛的结构多样性、引起健康风险的严重性及其高化学稳定性，开发有力且有效的检测技术至关重要。真菌毒素的数量通常比其他干扰物质少，需要独特的分析方法才能将每种毒素与其底物分开并研究。样品准备包括提取和纯化 2 个步骤。虽然操作方法清晰明确，但费用高且耗时长。近些年来人们致力于开发新型的真菌毒素检测方法。但这些新方法依然存在交叉反应困扰并需要其他方法进行确证。

最近有几篇文章对常用检测方法进行了综述[134-135]。其中包括免疫测定(如酶联免疫吸附测定)、荧光偏振免疫、表面等离子体共振和其他电导测量技术[136]。此外，高效液相色谱法(high-performance liquid chromatography，HPLC)和气相色谱(gas chromatography，GC)也广泛使用，并且随着大气压电离化技术的出现，液相色谱-质谱技术已经成为检测单端孢霉烯族化合物、赭曲霉素、玉米赤霉烯酮、伏马菌素和黄曲霉素等真菌毒素的常规方法[137]。继荧光标记高效液相色谱技术后，美国分析化学师协会最新认证的方法是基

于清除常规提取物的免疫亲和柱技术[38]。在过去的几年中，传感器和生物传感器等新方法因为其高敏感性、选择性、易用性和低成本，有希望成为经典分析方法的替代方法[138]。尽管此类技术的性能和适用性仍需要改进，但已被证明是分析黄曲霉素[139]、赭曲霉毒素[140]和玉米赤霉烯酮[141]的有效工具。对于真菌毒素检测技术开发的新进展，读者可从相关综述中了解[142-144]。

(三)气候变化的影响

根据不同国家的统计，世界上 1/4～3/4 的农作物不同程度地受到真菌毒素的污染[145-146]，这个比例也随着环境因素在不断变化。有证据显示，真菌毒素的产生受环境因素，包括气温、湿度、二氧化碳、干旱、虫害及其他植物应激源等影响。而且不同霉菌的致病性可能存在重叠，霉菌间的竞争受温度条件的影响[124]。评估不同真菌及其合成真菌毒素能力应在真菌最佳生长条件下进行。例如，赤霉菌属(特别是 *G. zeae*)是合成 DON 毒素的主要真菌；在温暖潮湿环境下，它们感染谷穗的能力会增强[147]。然而，在充足的降水量和较低的气温下，玉米污染相同真菌毒素的概率更大，因为禾谷镰刀菌和细角镰刀菌更容易生长[148]。另一个极端例子是伏马毒素和黄曲霉素在干旱条件下产量更多；冬季气候温暖、霜冻较少时，昆虫和植物更容易存活，导致植物更容易发生霉菌感染。近期的大量研究证明，3 个主要环境因素(温度、水的有效性和 CO_2)之间的相互作用对产毒真菌的生长和毒素的产生具有影响。Medina 等[149]在最近的一篇综述中对当前文献进行了总结。总而言之，任何特定区域的气候和环境变化都可能导致农作物损害和真菌毒素污染的数量和类型发生根本性变化。

(四)真菌毒素污染防治的现状与前景

目前，正在开发一些预防粮食真菌毒素污染的方法，这些方法涉及农作物栽培前、中、后各个环节，其中最可靠的预防方法依然是农作物的栽培技术和对农作物收割后存储设施的湿度控制技术的改进。虽然小麦和大麦已培育出耐真菌毒素品种，但其他农作物，如玉米和燕麦，仍然需要培育新的耐真菌毒素品种[150]。研究者已开始尝试转基因方法以获得抵抗产毒真菌的农作物品种，但是这些新品种还不能实现量产。有研究发现 Bt 农作物[通过转基因方式获得表达具有杀虫活性的苏云金芽孢杆菌(*Bacillus thuringiensis*)毒素的农作物]由于虫害减少而不易受到真菌毒素的污染[151]。此外，还发现杀虫剂可以抑制曲霉菌生长，从而可有效减少赭曲霉毒素 A 的累积[152]。

真菌病毒防治法是一种控制真菌毒素污染的生物学方法，真菌病毒可以通过真菌的无性孢子而易于播散，但目前这种方法虽然已经讨论但还没有实施应用。真菌病毒对其真菌宿主的影响很小，因此它们可以作为一种承载抗真菌感染基因的载体。随着病毒特异性分子检测方法的发展，这种方法可被广泛应用[14]。此外，研究发现在玉米抽穗之前使用黄曲霉非产毒株可以明显减少黄曲霉素的蓄积，这可能是通过黄曲霉非产毒株与产毒株之间形成竞争性抑制而造成的结果[153]。这种竞争抑制的方法前景可观，其有效性正在不同地区进行评估[154]。

事实证明，天然提取物是有毒化学杀虫剂和生物阻断剂(其有效性尚待确定)的安全替代品[155]；例如，精油、从草药和香料中提取的有机和水性提取物等天然提取物均具有杀菌和抗真菌毒素活性[156-159]。它们通过多种方法应用于食品工业中，例如，可食用薄膜[160]、活性包装[161]或通过蒸汽接触[162]。

近年来农作物收割后的真菌毒素降解成为一项新的研究热点。许多微生物(如土壤和水中的微生物、真菌、原生动物)和某些特异性酶类等都可以降解真菌毒素，特别是黄曲霉素[163]。在畜牧业中，当饲料发生真菌毒素污染后，添加碳酸钠和其他添加剂能成功降低死亡率和减轻毒素污染饲料喂养后引起的不良反应[84,164]。

三、生物恐怖主义

真菌毒素也可被用于实施生物恐怖主义行为，因此早在 1982 年美国国家研究委员会就设立了防护真菌毒素委员会[165]。经过多年的研究，Ciegler 于 1986 年证实了真菌毒素作为化学武器使用的可能性[166]。但选择黄曲霉素作为大规模杀伤性武器并不理想，因为黄曲霉素的毒性作用，如肝癌等，很难在战争期间迅速影响军队的战斗力。

相比之下，单端孢霉烯族毒素比黄曲霉素更适用于战争，因为接触这种毒素后可立即发生反应，数毫克的量即能导致人类死亡。历史上值得注意的是1981年的“黄雨事件(yellow rain)”[167]。美国指责苏联对柬埔寨和老挝的苗族部落使用瓜萎镰菌醇、DON毒素和T-2毒素，但是后来证实“黄雨事件”的元凶是野生亚洲蜜蜂群的排泄物[168]。

近年来，利用真菌毒素实施生物恐怖主义行为的风险已被多次评估[9,169-170]。黄曲霉素和单端孢霉烯族毒素同时存在时会发生毒性增强效应，这2种毒素联合时对人支气管上皮细胞的毒性会有协同效应[171]，但当广泛暴露于单端孢霉烯族毒素、漆斑菌素A和疣孢霉素A时二氧化氯可以起到有效解毒的功能[172]。T-2毒素和黄曲霉素因在海湾战争中可能作为生物武器使用而备受争议[173]。但是目前为止，没有明确数据表明战后退役老兵因某些真菌毒素中毒而致病[174]。事实上，真菌毒素是否已应用于生物战始终处以机密状态，因而人们并不能确定该假定是否成立。总之，即使真菌毒素武器有可能用于生物恐怖主义，但这种武器的稳定性和有效性被质疑，故并不适合用于战场上。

四、病态建筑综合征

病态建筑综合征(SBS)是一种泛指的术语，主要指居住者因某些室内环境因素引起的一系列的健康问题。建筑物通常涉及很多问题，包括水损害，加热不当，通风问题，空调系统，施工性能差，细菌、真菌及昆虫侵袭等。SBS的临床症状包括眼、鼻、喉刺激症状，乏力，头痛，注意力不集中，频繁呼吸道感染，呼吸急促，头晕眼花和恶心[175]。真菌毒素被认为是SBS的致病因素之一。目前，已知可合成这些毒素的真菌有链格孢菌、曲霉属、枝孢霉属、毛壳菌属和青霉属。其中纸葡萄穗霉是研究最为广泛的一种真菌。读者可参考其他综述了解更全面的相关知识，见参考文献[13]和[176]。

几十年来，大量关于SBS的综述认为没有证据表明建筑物内的霉菌在正常情况下会威胁到健康人群的生命[13,175]。另一个关于真菌毒素引起SBS症状的争论是大多数真菌毒素都不易挥发，因此不可能广泛传播。此外，适宜霉菌生长的条件不一定是真菌毒素产生的最佳条件，而且真菌产生真菌毒素的能力也不同。

然而，在过去的5年中，更多的研究评估了SBS症状与室内空气传播真菌相关毒素之间的关联；新的发现与先前的报道相矛盾，提示空气传播的真菌毒素对健康人的疾病和不适症状有重要关联[177-178]。与以前所认为的相反，使用高灵敏检测技术的最新研究表明许多真菌毒素是易挥发的并且浓度很高[179]；因此，真菌毒素对SBS的作用仍然是一个悬而未决的问题。

五、结论

自然界中存在多种真菌毒素，它们可以由许多不同种类的真菌合成。这些毒素可能与环境问题有关，如SBS、兽医学问题、生物恐怖主义和食品安全问题。过去十年中，在鉴别真菌毒素和控制毒素产生方面取得了一些进展，但还需要进行大量研究，以减少产生真菌毒素的真菌对人类、牲畜和植物种群健康的威胁及其对国际经济的影响。

参考文献请扫二维码查阅

第130章 拉卡菌、链壶菌、腐霉菌和鼻孢子菌

RAQUEL VILELA, LEONEL MENDOZA

（李轶 译；廖康、陆玲 审校）

本章描述的病原体属于过去一百年被分类至真菌和（或）非真菌的原生生物病原体[1-4]。流行病学特征显示它们与水相关，因此也曾被分类至亲水病原体[1]。然而，人们对这4种异常种类病原体（拉卡菌属、链壶菌属、腐霉菌属和鼻孢子菌属）的分类和形态学特征还并不完全了解[1,4]。随着分子生物学方法的出现，这一争议才得到解决[5-6]。尽管目前发现诡诈腐霉菌（*Pythium insidiosum*）和西伯鼻孢子菌（*Rhinosporidium seeberi*）是原生生物病原体，但延续传统，仍由真菌学家来研究它们。最近发现卵菌纲的链壶菌属（*Lagenidium*）和副亚链壶菌属（*Paralagenidium*）可感染哺乳动物宿主，这提示医学界一种类似真菌的新的病原体存在，它造成感染时的临床表现和病理学特征与诡诈腐霉菌感染的特征难以区分。除此以外，Vilela等[7]在海豚皮肤肉芽肿中发现，过去认为是罗波拉卡菌产生的酵母样细胞，实际是新的巴西副球孢子菌变种。基于rDNA进化分析方法，图130-1阐述了本章描述的病原体的进化位置。表130-1总结了病原体的显著特征。

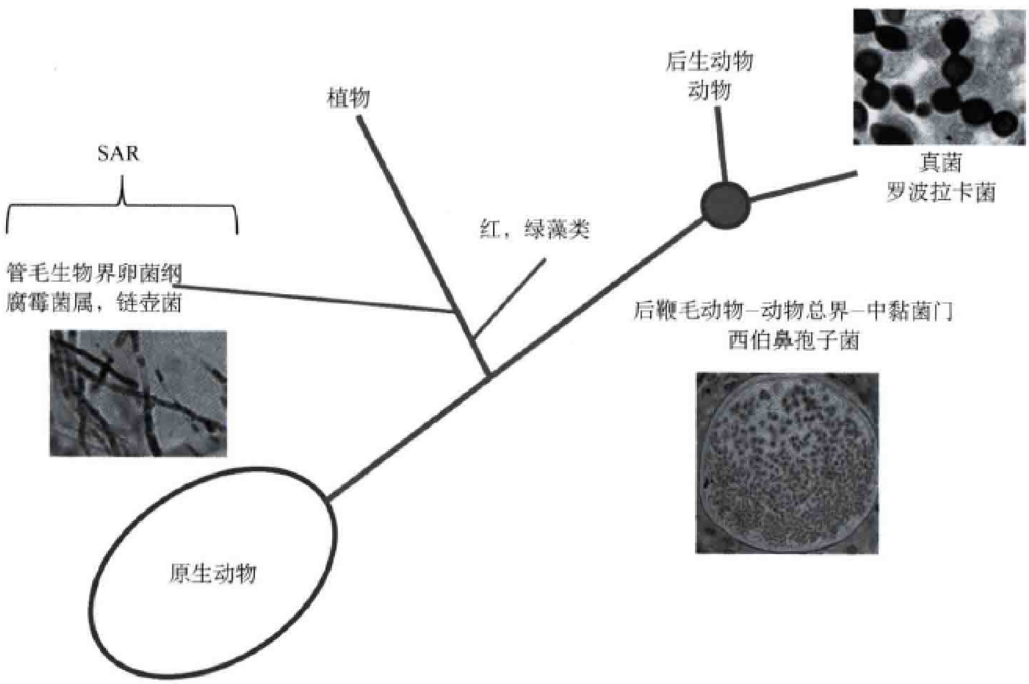


图130-1 利用小亚基核糖体DNA序列研究的本章4种微生物病原体的系统发生位置

注：藻类和管毛生物界是植物的底层[28]。管毛生物界包括哺乳动物的致病菌卵菌纲腐霉菌属和链壶菌属。它们发育成菌丝样结构，囊泡有双鞭毛游动孢子。西伯鼻孢子菌位于动物和真菌分叉的位置（圆圈所示）[28]，内生孢子形成的球形结构具有特征性。罗波拉卡菌（*L. loboi*）是特殊的子囊菌类真菌，不能培养，镜下呈链状的酵母样细胞，见彩插

表 130-1 不常见病原体罗波拉卡菌、巴西副球孢子菌鲸豚类变种、链壶菌和副球孢子菌，谲诈腐霉菌和西伯鼻孢子菌的分类、流行病学、临床表现和真菌学特征

病原体(宿主)	分类/系统发育	流行病学	临床表现	体内形式	体外形式
罗波拉卡菌(仅感染人类)	子囊菌纲 散囊菌目	局限在南美 人类感染 亲水性	皮肤瘢痕，头部、臂、胸、下肢损伤	柠檬形，小管连接的酵母样细胞链状排列	不能培养
巴西副球孢子菌鲸豚类变种(仅感染海豚)	子囊菌纲 爪甲囊团菌目 系统发生学上不同于罗波拉卡菌	局限于各个大洋的海豚类	海豚皮肤瘢痕	柠檬形，小管连接的酵母样细胞链状排列	不能培养
链壶菌种和副球孢子菌种(感染人和动物)	SAR 超类群(原生生物) Stramenpiles 被称为"水中的霉菌"	热带、亚热带、温带地区 外伤时水中或陆地环境中的细菌引起感染 亲水性	角膜炎，皮肤溃疡、损伤，侵犯大血管和肺	稀疏有隔的菌丝 8～20 μm Splendore-Hoeppli 现象，嗜酸性粒细胞显著增多	凹陷生长，稀疏有隔的菌丝 10～25 μm，有些有大的球形结构，双鞭毛游动孢子，蔗糖试验阴性
谲诈腐霉菌(感染人和动物)	SAR 超类群(原生生物) Stramenpiles 被称为"水中的霉菌"	热带、亚热带、温带地区 外伤引起水中或陆地上环境感染 亲水性	角膜炎，感染皮层，小肠，毛细血管；侵犯其他器官，如肺	稀疏有隔的菌丝 4～10 μm Splendore-Hoeppli 现象，嗜酸性粒细胞显著增多	凹陷生长，稀疏有隔的菌丝 5～12 μm，无子实体，双鞭毛游动孢子；蔗糖试验阴性
西伯鼻孢子菌(感染人和动物)	原生生物界 中黏菌门 系统发育位于动物和真菌的分界上	各大洲除澳洲外均出现过 印度和斯里兰卡流行 外伤引起	黏膜息肉和皮肤损伤 口、鼻、眼常见	球形孢子囊 发育的不同阶段有或无芽孢	不能培养

一、罗波拉卡菌

(一)分类法

Jorge de Oliveira Lobo 首次在巴西伯南布哥州发现了拉卡菌病[8]。他发现这种新的病原体类似寄生阶段的芽生菌(*Blastomyces*)和副球孢子菌(*Paracoccidioides*)。最早人们曾尝试分离培养这种病原体，但很快发现这种病原体无法培养[4,9]。这造成该病原体在流行病学和分类学存在争议，多种不同命名就是例证。1999 年，Taborda 等[10]建议以罗波拉卡菌这一名字结束它 70 多年分类学不明确的历史。而 Vilela 等[11]建议用拉卡菌命名更合适，因为 *lobomycosis* 源于废弃的 *Lobomyces* 属[4]。他们基于 Taborda 等[10]的提议，将罗波拉卡菌从副球孢子菌中分离出来作为独立的分类群[11-13]。最初的系统发生学研究将罗波拉卡菌作为巴西副球孢子菌(*P. brasiliensis*)的姊妹分类群[5,12]，但是，除了长分支中描述这些病原体之间的系统发育分析，没有足够的 DNA 序列证据支持这一观点[14]。Vilela 等[11]研究了至少 5 个不同的基因位点和 20 个罗波拉卡菌的临床菌株，提出在系统发育上把这一病原体作为一个独立的分类单元。目前，罗波拉卡菌归类于子囊菌门，瓜甲团囊菌目，阿耶罗菌科。

1971 年第一例来自海豚的类拉卡菌病被报道[15]。基于临床表现、组织病理学和血清学分析以及病原体不能培养的特性，长期以来这种病原体都被认为与人患罗波拉卡菌相同[4,7]。但最近的分子生物学分析发现，来自不同区域海豚的酵母样细胞与造成人类系统感染的巴西副球孢子菌在 DNA 序列上具有亲缘性[16-18]。感染美国的 6 种海豚的酵母样病原体的系统发生学研究结果也印证了这一点[7]。这项研究表明，包括早期研究的海豚病原体在内的 DNA 序列与可培养人患巴西副球孢子菌的 DNA 序列有亲缘性。这些发现动摇了罗波拉卡菌作为独立于副球孢子菌属的理论支持。Vilela 认为，如先前所怀疑的一样，拉卡菌属实际上是另一种副球孢子菌物种[4,7]。系

统发育学研究无法将可培养的人患巴西副球孢子菌与海豚病原体的 DNA 区分开。因此，Vilela 和 Mendoza 最近提出了用巴西副球孢子菌鲸豚变种和鲸豚副球孢子菌病来区分不能培养的海豚患病原体与可培养的人患巴西副球孢子菌（表 130-1）[7,19]。对更多人类和海豚病原体的 DNA 序列甚至完整的基因组分析，将进一步揭示出这 2 种被忽视的、不可培养的真菌病原体的进化情况。

(二)特征描述

由于罗波拉卡菌不能培养，人们对它的认识来自于其寄生阶段的形态学特征。它在体内具有单细胞发育的特征，厚壁，柠檬形，酵母样细胞，两个或多个细胞可呈链排列，偶尔呈长枝形，有短管特征性连接（图 130-2）。罗波拉卡菌的酵母样细胞直径为 5～12 μm，大多数染色均可观察到。有趣的是，罗波拉卡菌在体内的表型与寄生阶段的巴西副球孢子菌非常相似。这与现在的系统发育学研究结果一致[7]。根据罗波拉卡菌的形态特征、与拉卡菌患者血清试验的交叉反应和巴西副球孢子菌的抗原，Almeida 和 Lacaz 将此病原体归类于副球孢子菌[4]。经电子显微镜分析，罗波拉卡菌显示出厚壳质的酵母样细胞壁和无定型的细胞质成分。大约 60%的酵母样细胞缺乏明确的细胞质区域，这与其他研究结果一致。

(三)流行病学和传播

人拉卡菌（Jorge Lobo's disease）病仅出现在美洲热带地区[8]。尽管大部分的拉卡菌病例来自于巴西，但是墨西哥、中美洲、哥伦比亚、苏里南、委内瑞拉和其他附近国家也有病例的报道[4]。2 例欧洲患者曾在水族馆里接触了受感染的海豚。此外，美国和加拿大的患者曾在疾病发生地区访问或工作过[20-21]。最近有报道称希腊 1 例女性患者并没有去过美洲，根据组织形态学结果而被认为感染了拉卡菌病[22]。但这个特殊患者的酵母样细胞缺乏图 130-2b 和图 130-2c 描述的一些形态特征，也没有做分子实验去进一步证实此病。

皮肤损伤后接触含病原体的水源会引发感染。此病原体真正的传播途径尚未明确。健康人似乎也会感染。罗波拉卡菌有菌丝繁殖体（也许是分生孢子），可能通过创伤接触宿主因而使其感染拉卡菌，类似于巴西副球孢子菌的传播途径。该疾病在人与人之间的传播是罕见的，但有病例是自体移转或临床医生接触感染的患者而感染[4,23-24]。此外，这种疾病可以通过老鼠实验重现[25]。

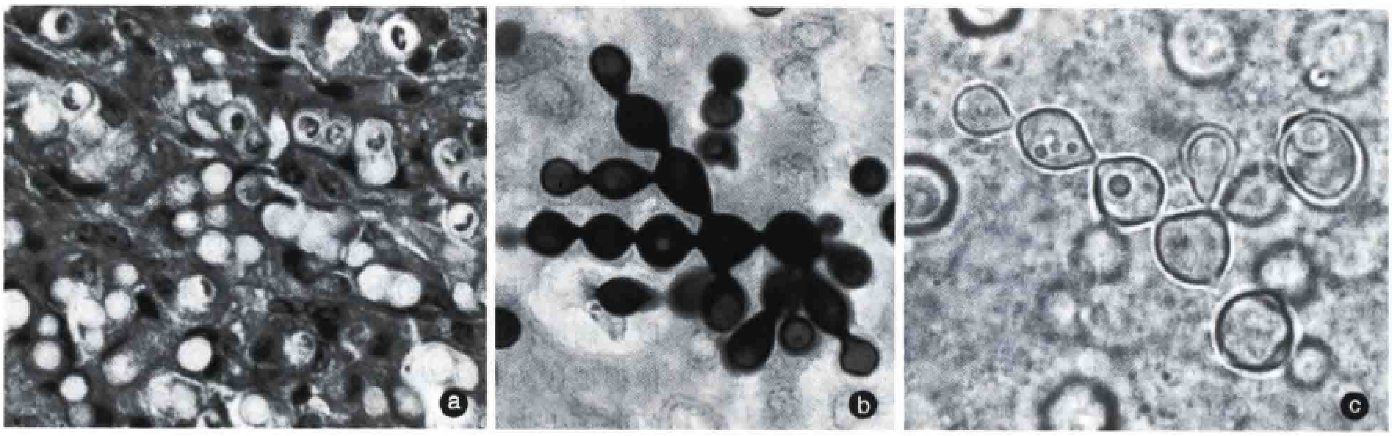


图 130-2 罗波拉卡菌的组织切片，HE 染色(a)和六胺银染色(b)显示皮肤拉卡菌病的典型形态学特征

注：a. 罗波拉卡菌酵母样细胞 HE 染色着色差，有空轮结构，周围包绕肉芽肿反应。放大倍数：×40。b. 六胺银染色中，罗波拉卡菌的典型特征是柠檬形酵母样细胞由小管连接呈链状排列。放大倍数：×50。c. 10% KOH 湿片中，大量罗波拉卡菌酵母样细胞链状排列，在一些细胞的胞浆中有活动的颗粒。放大倍数×100，见彩插

(四)临床意义

在疾病流行的美洲热带地区，罗波拉卡菌引起的感染也很少见。最近报道的在疾病流行地区的人类感染病例均是散发的，并且大多是男性感染。迄今报道的病例数是 600 例左右，但真正的数量可能会更高。在这些地区居住的健康人也会感染此病。在巴西，发病率高的一个部落移居到

另一地方时，病例数急剧减少，所以不认为该病有遗传倾向。在这些地区有一个普遍性的问题，多数患者感染后因贫穷或症状轻微不会立即去医院就诊，任其扩散至皮肤的其他区域[4]。

感染的部位通常是手臂、耳朵、后背、胸、脸和下肢。一些研究者认为人感染的部位均在皮肤较冷的区域，说明病原体并不能耐受 37 ℃的温度。最初皮肤损伤是单个小的(直径 0.5～1.0 cm)、光滑的瘢痕。在此阶段患者会有轻微的皮肤瘙痒。感染不会威胁生命，通常进展缓慢，有时会超过 20 年或以上。当患者去看病时，病变通常已进展到不止一个。在慢性阶段，病变是多样化的。至少有五种临床表现，包括典型瘢痕、浸润型、树胶肿、溃疡和疣。但 Lacaz 等[4]指出一个患者可能会出现包括黄斑的 2 种或多种临床表现。鉴别诊断包括着色芽生菌病、利什曼病、麻风病、肿瘤、副球孢子菌病及其他类似皮肤病。

(五)标本采集、运送和储存

标本采集、处理、储存和检验的指南详见第 117 章。拉卡菌病临床标本主要是感染部位的活组织切片。罗波拉卡菌无法培养，所以感染部位的临床标本通常用甲醛固定后进行病理学检查。

(六)直接检测

1. 显微镜检查　与巴西副球孢子菌感染的系统性播散不同，罗波拉卡菌的感染仅限于皮肤或皮下组织。感染的典型特征是纤维化和肉芽肿反应，出现组织细胞和巨细胞浸润并包含有大量罗波拉卡菌酵母样细胞，也可出现坏死和其他炎性细胞浸润。当用苏木素和伊红染色时，罗波拉卡菌为染色浅的椭圆到球形的细胞或环状排列的厚壁细胞(图 130-2a)，很难观察到组织中典型的链状排列酵母样细胞。组织病理学诊断拉卡菌病时应使用真菌特殊染色如六胺银染色(Gomori methenamine silver，GMS)和过碘酸希夫染色(periodic acid-Schiff，PAS)。用六胺银染色时，罗波拉卡菌酵母样细胞染成深色或空泡样细胞(图 130-2b)。2 个或多个酵母样细胞呈链状排列或形成分枝，与副球孢子菌病病感染组织中的酵母细胞类似。细胞之间由小管特征性连接，用其他真菌染色方法如 PAS 染色也能观察到这一特征(图 130-2b 和图 130-2c)。鲸豚副球孢子菌病的海豚中发现了相似的显微结构特征。

直接镜检诊断拉卡菌病时，组织标本应切成直径 2～5 mm 的小块。一块或多块组织放到玻片上，滴加 1 到 2 滴 10 %～20 % KOH，盖上盖玻片，稍加热，但不能煮沸，放置室温 15 min 后再镜检。在 10% KOH 中，酵母样细胞大量出现(图 130-2c)。酵母样细胞直径 2～12 μm，可单个存在或由小管连接 3 个或多个细胞呈链状排列，大小较均一。湿片中可观察到在一些酵母样细胞中出现活动的细胞质颗粒(图 130-2c)。

2. 核酸检测技术　目前，尚无检测临床样本中该病原体的商品化核酸探针。

(七)分离、鉴定和分型系统

有报道称已经培养分离出罗波拉卡菌，但此消息未经证实。获得的大部分病原体是污染真菌或巴西副球孢子菌[4,9]。

临床表现、镜检特征或感染组织病理学分析是该病原体的主要诊断根据。目前，并无该病原体的分型系统。然而，用已报道过的引物对疑似组织进行分子学检测可以进一步证实组织病理学的发现[9]。

(八)血清学试验

病原菌无法培养是拉卡菌病血清学试验发展的主要障碍。大多数血清学方法需要使用感染组织中寄生的病原体或与其密切相关的病原体作为抗原[4]。试验表明，罗波拉卡菌与皮炎芽生菌(*Blastomyces dermatitidis*)、荚膜组织胞浆菌(*Histoplasma capsulatum*)和可培养的巴西副球孢子菌等真菌病原体有交叉抗原[4]。Mendoza 等[26]从感染罗波拉卡菌的实验小鼠的酵母样细胞中提取蛋白，将其作为抗原，发现被感染的患者、海豚和老鼠的血清中存在罗波拉卡菌抗体，这种抗体为 193 kDa 的免疫显性蛋白。尽管血清中的这一抗体与巴西副球孢子菌的纯化 *gp43* 抗原能发生反应，但他们并没有在罗波拉卡菌的寄生阶段检测出相应的 *gp43* 抗原[26]。此发现表明，193 kDa 的蛋白与巴西副球孢子菌的 *gp43* 有共同抗原表位。这也意味着，尽管拉卡菌感染时表达的 193 kDa 抗原与巴西副球孢子菌的 *gp43* 抗体有交叉反应，但它可能是一个完全不同的抗原蛋白。罗波拉卡菌抗原蛋白在拉卡菌病发病机制中的作

用正在研究中。有学者建议用罗波拉卡菌抗原的血清学试验来研究拉卡菌病的流行病学[26]。尽管还没有血清学试验的商品化试剂，密歇根州立大学的生物医学诊断实验室已经研发出蛋白质印迹试验，可在以下网站查看 https://bld.natsci.msu.edu/research/pythium-insidiosum/。

(九)抗菌药物敏感性试验

尽管抗真菌治疗已治愈了几例拉卡菌病例，但是罗波拉卡菌对抗菌药物的耐药性众所周知，包括大多数抗真菌药物[4]。于是临床医生只有一个选择——手术。由于此病原体难以培养，药敏试验也无从做起。

(十)结果的评价、解释和报告

拉卡菌病的临床标本采集包括深部皮肤刮取法和组织活检。样本处理包括之前描述的直接检查和显微镜检查，并观察是否存在均一的由小管连接形成短链状的酵母样细胞。由于巴西副球孢子菌在寄生阶段也能形成小管连接的酵母细胞，大小的不同可用于区分罗波拉卡菌和巴西副球孢子菌。后者在感染组织中可发展成大小不等的酵母细胞，而前者的酵母样细胞大小均一。另外，真菌培养不能生长也有助于诊断该病原体。实验室对临床资料评估后，均一的酵母样细胞存在且真菌培养无生长可证实是拉卡菌病。是否去过疾病流行地区也非常重要。结果报告应包括均一的有小管连接的酵母样细胞，真菌培养无生长和组织标本的病理学评估。

二、谲诈腐霉菌

(一)分类学

谲诈腐霉菌于150多年前在印尼首次报道[3]，但是直到20世纪才通过纯培养分离到该病原体。随后，一种相似的病原体从马中分离出并命名为 *Hyphomyces destruens*。新几内亚的一个菌株能生成游动孢子，说明这一微生物属于腐霉菌属[27]。De Cock 等[3]发现了二相型谲诈腐霉菌，把其归于 SAR 超类群(stramenpiles，alveoates，rhizaria)[28](图 130-1)。系统发育研究表明，谲诈腐霉菌群的系统发生取决于起源地[29-30]。因此，谲诈腐霉菌可能是与系统发生密切相关的物种复合体，也可能是同一个属种不同菌株的复合体[31]。

(二)特征描述

谲诈腐霉菌可在大多数真菌培养基上分离到[3]。白色菌落，凹陷生长，放射样，很少有气生菌丝，与哺乳动物的病原体链壶菌种相似(图 130-3a)。菌丝有垂直侧向分支，直径 4～10 μm，有几个横隔(图 130-3b)。在包含多种离子(包括钙离子)的水中培养，才能生成游动孢子[3,32-33]。游动孢子生成的结构称为囊泡(图 130-3c)。

游动孢子逐步分裂，在大囊泡(直径 20～60 μm)中成熟(图 130-3c)。一旦完全成形，有着双鞭毛的游动孢子会打破孢子囊壁，游动然后形成包囊。由于其活动性，游动孢子可能是传染单位。游动孢子呈肾形，有 2 个源自侧向槽内的不等鞭毛。一旦形成包囊，游动孢子会失去鞭毛变成球形。在适当的条件下，包囊内的游动孢子发出一个芽管，形成长的细丝[32]。谲诈腐霉菌的卵原细胞(有性阶段)很少观察到，这种形态被认为是一种环境抵抗阶段。

(三)流行病学和传播

在热带、亚热带和温带，均有这一亲水病原体造成感染的报道。在美洲的热带地区腐皮病很常见，大部分病例出现在巴西、哥伦比亚、哥斯达黎加、美国和委内瑞拉[3,32]。在美国南部各州，动物和人的感染更普遍，如阿拉巴马州、乔治亚州、弗罗里达州、路易斯安那州、密西西比州、北卡罗来纳州、南卡罗来纳州和得克萨斯州。然而其他州也有病例报道，包括加利福尼亚州、伊利诺斯州、印第安纳州、堪萨斯州、新泽西州、密苏里州、田纳西州、弗吉尼亚州，以及北部的威斯康辛州和纽约。亚洲地区的日本、印度、印度尼西亚、太平洋群岛、韩国、泰国和附近地区如澳大利亚、新几内亚和新西兰均有腐皮病的报道。热带非洲是腐皮病的好发地区。然而，仅有的 1 例狗皮肤感染病例来自于非洲西北部国家马里，这表明在非洲地区这种疾病可能被误诊了[29]。

目前普遍认为，谲诈腐霉菌引起的感染是外源性的。这种疾病仅限于在热带地区的动物，而其他地区很少或根本没有出现。有趣的是，在过去的 10 年里腐皮病的数量在各大洲均有增加[3,31]。研究发现人类[32-37]、狗[38-39]及其他动物可被感

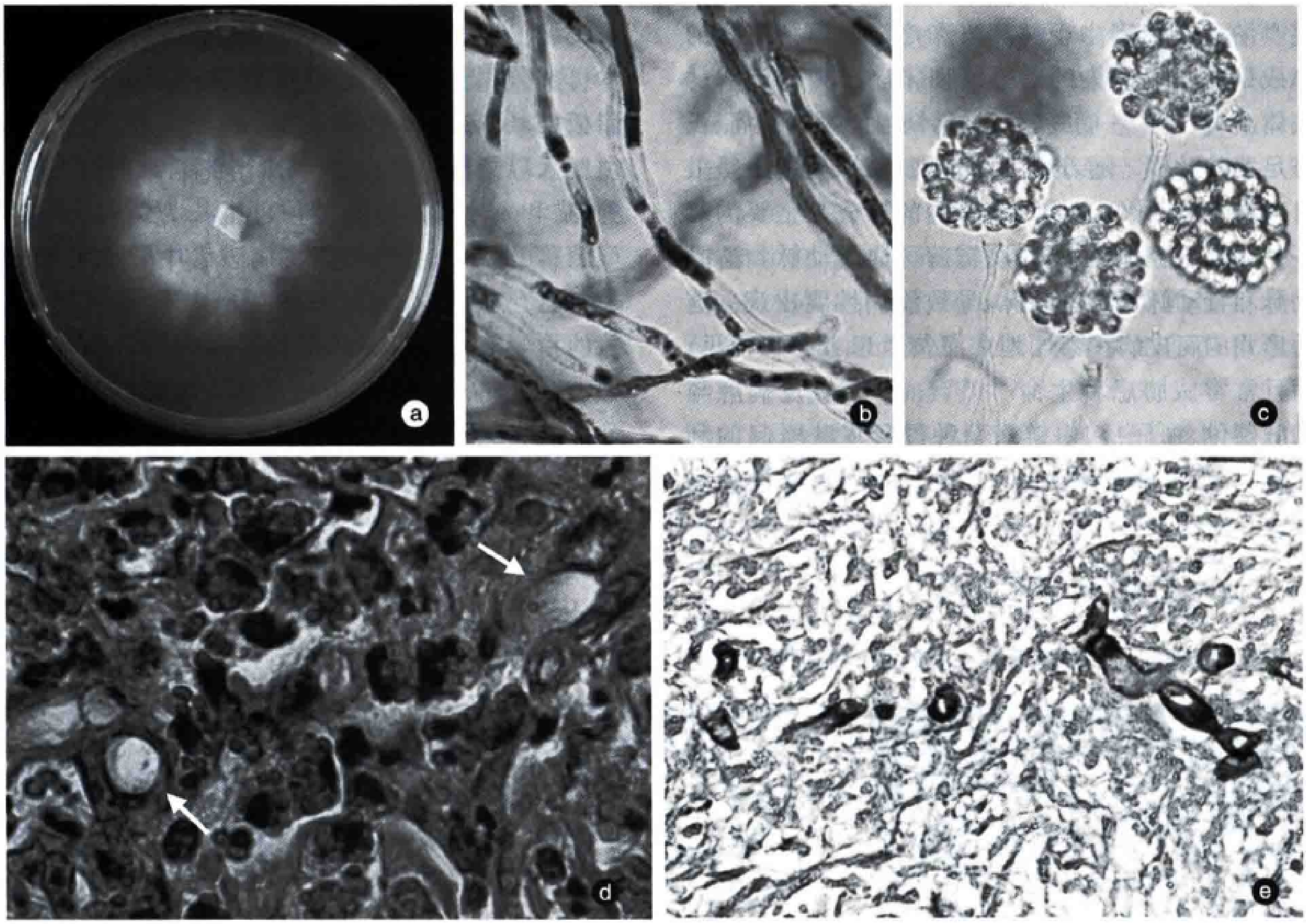


图 130-3　谲诈腐霉菌

注：a. 谲诈腐霉菌在 SDA 上的菌落，凹陷生长，很少有气生菌丝。b. 细长稀疏有隔的菌丝，无子实体。放大倍数，×40。c. 谲诈腐霉菌的 4 个囊泡，包括大量未孵化的游动孢子。放大倍数，×40。d. 从一例人腐皮病中分离的谲诈腐霉菌染色后发现其菌丝周围有嗜酸性粒细胞。注意菌丝周围的嗜酸性粒细胞反应（Splendore-Hoeppli 现象）（箭头所示）。放大倍数，×100。e. 感染宿主中谲诈腐霉菌菌丝银染色的典型特征。放大倍数，×50，见彩插

染，这一发现表明之前的腐皮病被误诊为真菌感染。大多数腐皮病病例发生在健康的人和动物。然而在泰国，人类发生该病与地中海贫血或类似的血液疾病有关[35]。

谲诈腐霉菌繁殖体主要通过创伤性损伤进入皮肤或肠道导致感染[32,39]。潮湿环境易引发感染。通过对环境样本中的谲诈腐霉菌进行培养和鉴定，Supabandhu 等[40]、Presser 和 Goss[41] 及 Rujirawat 等[42] 证实了泰国和美国的潮湿农业环境中卵菌纲的存在。另外，与水无关的腐皮病表明在接触陆生环境中的休眠孢子后，谲诈腐霉菌可引发感染。谲诈腐霉菌在个体之间（人或动物）的传播尚未有过记录。似乎只有兔子适于谲诈腐霉菌实验接种[43]。

（四）临床意义

腐皮病的临床表现根据感染部位而异。大多数患者反映在其感染之前曾有皮肤损伤。谲诈腐霉菌所引起的人类感染病变可以分为浅部感染型（角膜炎）、皮肤皮下型（如眼眶腐皮病）及血管损伤型（常导致全身性感染和死亡）。谲诈腐霉菌所引起的角膜炎与真菌性或其他病原菌引起的角膜炎相似[44-46]。损伤首先始于眼睛的表层创伤，之后发展为结膜炎、畏光、角膜溃疡、眼前房积脓（脓液在眼前房）。皮肤和皮下感染的特点是肉芽肿斑块的形成和（或）局部溃烂。一旦病原菌进入皮下组织，可发展为痒疹。皮下的腐皮病在眼眶是很少见的，已发病例主要在澳大利亚和美国的儿童中[47]。血管性的腐皮病起源于一个外伤的病变，通常在下

肢，随着病原菌的播散到达邻近的动脉[38,47]。有报道[34]在一些患者中干性坏疽和疼痛的坏死溃疡的形成是皮肤的感染的信号。临床症状为受影响的肢体出现跛行(一瘸一拐)、局部缺血、肿胀、疼痛、没有足背的脉搏。随着感染的进展，动脉炎发生呈上升趋势，大动脉的血栓和动脉瘤的形成是主要的特征。如果未经治疗，谲诈腐霉菌可通过动脉到达肠动脉和肾动脉及腹主动脉，导致浸润性腐皮病。这种形式的腐皮病在泰国地中海贫血患者中很常见，而且常常威胁患者生命[34,36-37]。人类腐皮病应与动脉硬化、糖尿病、由链壶菌种侵犯皮肤引起的利什曼病、真菌性角膜炎、皮下结核、皮下毛霉菌病和其他与丝状真菌相关的真菌病进行鉴别。

(五)标本采集、运送和储存

诊断腐皮病的临床标本应根据不同宿主和不同临床感染形式而定[31,34]。谲诈腐霉菌临床标本采集、运送和储存方法与链壶菌属相同。组织标本可部分用于镜检，也可接种于沙保弱葡萄糖琼脂板(Sabouraud dextrose agar，SDA)。组织块必须置入琼脂板中并在 37 ℃ 中孵育 24～48 h。对狗、猫和人致病的链壶菌种可生长为黄白色，光滑型菌落(图 130-4a)，与腐皮病患者中分离的相似。其广泛存在，大小为 9～18 μm，从狗分离到的菌株的主要特征是合胞体菌丝显示为短链菌丝连接的大球形结构(图 130-4b)。从人角膜炎的病例中分离到一株链壶菌显示为宽大的有隔菌丝[48]。链壶菌菌株有短链菌丝连接的球形结构可与谲诈腐霉菌相区别(图 130-4b)。然而，一些哺乳动物致病性链壶菌仅仅生长为菌丝，这种情况下必须使用分子生物学方法鉴别(见下文)。迄今为止，链壶菌种尚无有效的系统分型。

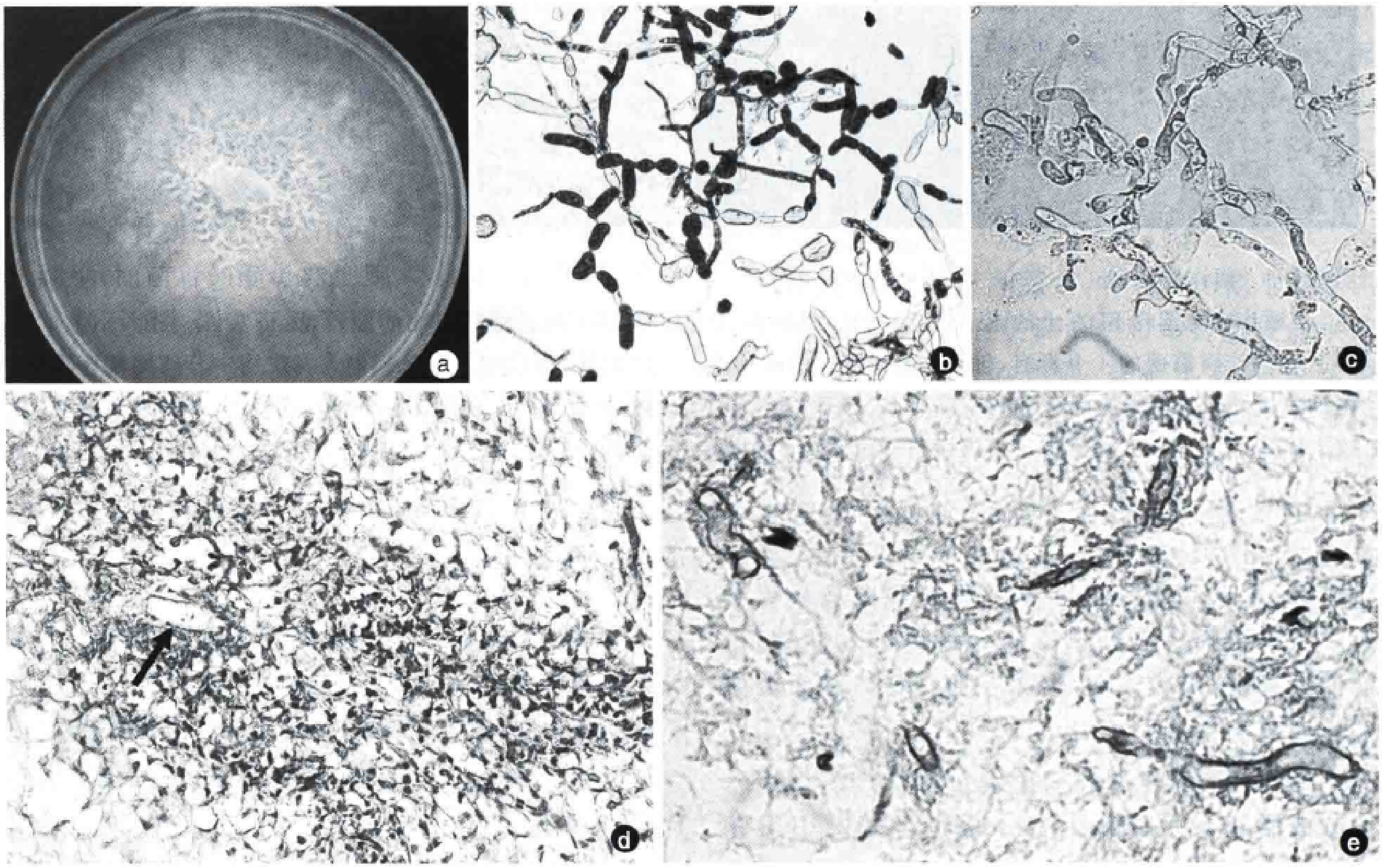


图 130-4 链壶菌种

注：a. 从狗活组织检查中分离的链壶菌种在 SDA 上菌落形态。链壶菌种在 25 ℃ 和 37 ℃ 下产生奶白色内生型菌落。b. 从琼脂板采集的样本在显微镜下带状菌丝形态。用乳酚蓝染色，在一些菌株中存在大的球形和椭圆形结构。然而有些菌株可能只培养出菌丝。放大倍数，×20。c. 用 10% KOH 从活组织检查中发现的一些无隔菌丝。放大倍数，×40。d. 猫感染 *L. deciduum* (*L. vilelae*). 组织病理 HE 染色。放大倍数×40。注意直径为 12～18 μm 菌丝围绕着嗜酸性细胞(Splendore-Hoeppli 现象)(箭头所示)。e. 图组织样本经过 GMS 染色，显示了 *L. deciduum* 的宽带状菌丝。放大倍数，×40，见彩插

角膜炎患者应从感染的眼睛用拭子采样或刮屑。干燥的临床标本会影响链壶菌种菌丝的镜下观察和随后的培养。拭子必须在常温保湿(或者含有少量的无菌蒸馏水)条件下立即送到实验室及时处理。采自眼部的刮屑应置于小的无菌培养皿中室温运送到实验室并及时处理。从患者的皮肤、皮下、血管采集的临床标本和播散性链壶菌病标本也可置于含有100 U/ml青霉素和0.25 mg/ml链霉素或者0.4 mg/ml氯霉素的无菌蒸馏水离心管中。如果这些抗生素不可用,可使用无菌蒸馏水。有关研究表明链壶菌病的标本在4 ℃储存运输时,对实验室分离致病菌无影响,但是其他报道称4 ℃储存的样本培养阳性率大大的降低[31-32]。读者可查阅第117章了解更多有关标本采集的内容。

(六)直接检测

1. 显微镜检查　谲诈腐霉菌的临床样本在10%KOH中表现为长的(直径4.0～9.0 μm)、透明的、少有分隔菌丝的典型结构(图130-3b)。卵菌纲的一个典型特征是菌丝可成90°分枝,长度可超过15 μm。在组织病理学HE染色中,谲诈腐霉菌呈长短不一,透明,直径6～10 μm的合胞体(无隔)菌丝(图130-3d)。通过HE染色观察谲诈腐霉菌在体内的结构可区分具有菌丝形态的*Enthomophthorales*[蛙粪霉属(*Basidiobolus*)和耳霉属(*Conidiobolus*)]中的卵菌纲。在感染组织中谲诈腐霉菌激活与嗜酸性肉芽肿相关的巨噬细胞、肥大细胞等炎症细胞(图130-3d)。在微小脓肿中心可发现大量含有谲诈腐霉菌菌丝的嗜酸性粒细胞(图130-3d,箭头所示)。嗜酸性粒细胞被激活后可出现Splendore-Hoeppli现象的炎症反应,这是*Entomophthorales*常见的特点。大多数专家认为很难将谲诈腐霉菌的菌丝结构与其他*Entomophthorales*中具有类似结构特点的菌种区别开,比如它们的HE染色均较浅。但是*zygomycetes*的条带式形态及*zygomycetes*的较大的细长菌丝可以帮助区别。谲诈腐霉菌菌丝的GMS染色效果较好,长短不一,很少有分隔的、暗的管状结构(图130-3e)。如菌丝被横向截断,用GMS或PAS染色效果不好,但仍可找到环状的菌丝体。

最重要的免疫组化实验是在感染组织中采用过氧化物酶和免疫荧光检测特异性识别谲诈腐霉菌的菌丝[49]。因为很难将谲诈腐霉菌与其他类似真菌区别开,特别是*mucormycetes*和*entomophthorales*(之前的*zygomycetes*)。这些实验在没有培养的情况下准确识别卵菌纲是至关重要的。这些大多数实验可通过美国密歇根州立大学的腐皮病参考实验室(https://bld.natsci.msu.edu/research/pythium-insidiosum/)和泛美兽医实验室(http://pavlab.com)及其他国家如巴西和泰国的相关实验室查询到。

2. 核酸检测技术　首次运用分子诊断技术从角膜炎患者的临床标本中检测谲诈腐霉菌[44]。菌种的菌丝体可通过采用18S rDNA的NS1、NS2和ITS序列的通用引物进行扩增并测序鉴定。该方法已被成功运用于临床标本[36,44]。Grooters和Gee[50]运用PCR技术鉴定临床样本培养物中的谲诈腐霉菌。谲诈腐霉菌的ITS-1的105bp序列可使用一对引物(PI-1和PI-2)进行检测。这些引物已经在部分实验室用于对丝状真菌的检测[36]。Schurko等[51]运用530bp的物种特异性DNA探针的斑点杂交技术来检测谲诈腐霉菌。该探针特异性结合该病原菌属间隔基因1(IGS1),并且不与23个其他腐霉菌属种、*Lagenidium gigantum*或一些致病性真菌包括*entomophthoramycetes*真菌如冠状耳霉(*Conidiobolus coronatus*)和蛙粪霉(*Basidiobolus ranarum*)的基因组DNA杂交。该探针对检测环境样本和临床样本中的谲诈腐霉菌是合适的。还有其他的分子检测方法,但实用性有限[52]。

(七)分离、鉴定和分型系统

与本章中其他亲水病原体不同,链壶菌种(见下)和谲诈腐霉菌可用不同培养基进行培养。分离谲诈腐霉菌的最常见培养基是2%的SDA、含或不含抗生素的肉汤(见标本采集、运送和储存)、血琼脂培养基、玉米基琼脂培养基、马铃薯葡萄糖培养基和营养琼脂培养基。在疑似腐皮病的患者的活组织检查或者尸检的组织和kunkers(仅在马腐皮病发现的多发硬包块),接种前通常将其切成直径2～5 mm的小块,置于加有无菌蒸馏水的离心管中,用力洗涤2～3次。将组织块推进琼脂,并将平板置于25 ℃和37 ℃中孵育2天或者更长时间。培养箱的相对湿度可通过放置一盛有水的

烧杯来提高。运送时间超过 24 h 的标本可以接种于肉汤管，在 37 ℃条件下孵育。24～48 h 后可以在标本周围发现絮状菌落[31]。在固体培养基上，谲诈腐霉菌仅生长为少分隔的菌丝（图 130-3b）。前面已描述了谲诈腐霉菌在固体培养基上的形态。

可以仅通过菌株在培养板上是否产生典型的卵原细胞（有性期）来最终鉴定谲诈腐霉菌。但卵原细胞非常少见，使该病原菌临床最终鉴定进一步复杂化。哺乳动物感染链壶菌属和谲诈腐霉菌的临床表现相似，谲诈腐霉菌在水中产生游动孢子可作为诊断依据。推荐使用上述分子方法来鉴定培养分离株和临床样本中的谲诈腐霉菌[参见“核酸检测技术（见上文）]。这种方法的缺点是只有少数实验室具备这些能力。虽然已有临床实验室使用糖类实验鉴定此类病原体的评估，但目前还没有可用的谲诈腐霉菌分型系统[53]。

（八）血清学试验

早期血清学试验表明，感染宿主的血清中可检测到抗谲诈腐霉菌抗体，因此可用于诊断腐皮病。最常见的诊断腐皮病的方法是凝集反应、酶联免疫吸附试验（ELISA）、免疫扩散和免疫印迹。免疫扩散可产生多条沉淀带，特异性高，但因敏感性过低易致假阴性，尤其是使用腐皮病的人血清和狗血清时更易出现[54]。为了克服该缺点，人们引进了 ELISA 和蛋白免疫印迹的方法[36,38,54-56]，这些方法诊断抗谲诈腐霉菌的 IgG 非常敏感。但它与抗链壶菌种抗体存在交叉反应[57]。凝集试验是腐皮病的快速诊断方法，可作为一种良好的筛查实验，但假阳性和假阴性率偏高[58]。研究发现当检测不同地区来源的谲诈腐霉菌菌株时，不同宿主血清中的抗体识别不同抗原蛋白，提示多种谲诈腐霉菌菌株可导致亚临床感染[59]。最近一种快速干式免疫层析法开始被评估，这种方法可以检测患病人和动物血清中的谲诈腐霉菌抗体，但它的敏感性较传统 ELISA 法低（假阴性较多）[60]。

（九）抗菌药物敏感性试验

谲诈腐霉菌类似其他卵菌纲（包括链壶菌种），其细胞质膜不含有麦角固醇。尽管有明确的药物使用禁忌，两性霉素 B 和其他针对麦角固醇的抗真菌药一直在使用，但疗效各不相同。例如，两性霉素 B 成功治愈了澳大利亚的 2 个患有眼眶腐皮病的儿童[47]。但治疗泰国同样的疾病患者却无效[35,37]。目前，对从田纳西州一位眼眶腐皮病的患儿中分离的菌株进行了抗生素敏感实验，结果表明该菌株对特比萘芬和伊曲康唑有较低的 MIC[61]。虽然这 2 种抗真菌药物的联合疗法成功治愈该患者，但同样的治疗方法用于其他患者或动物疗效欠佳。抗真菌药物的联合疗法可能通过固醇类以外的其他途径发挥作用。大多数抗真菌药物治疗腐皮病的疗效不一，可考虑使用免疫疗法等非传统的治疗[37]。免疫疗法治疗 55% 的人患者和患犬、70% 的患马有效[58]。研究者对一些抗真菌药物联合运用进行了体外试验，并取得了一定成效[49,62-64]。这些研究指出特比萘芬加氟康唑或酮康唑[63]，或者特比萘芬加两性霉素 B[64]，大幅降低了谲诈腐霉菌的体外生长。但这些抗真菌药物的联合用药还尚未进行临床实验。

（十）结果的评价、解释和报告

培养法是诊断腐皮病的金标准。谲诈腐霉菌在被感染组织的形态学特点可与 *entomophthoromycetes* 真菌耳霉属和蛙粪霉属相鉴别。实验室鉴别病原菌时，需要从整体上评估直接镜检、病理组织切片、血清学检查和培养结果。例如，直接镜检发现了少分隔的透明菌丝，就必须通过培养鉴定证实。血清学方法如 ELISA 和蛋白免疫印迹，如果在疑似腐皮病患者中检测出抗谲诈腐霉菌抗体，需要结合临床症状进行确认。疾病流行地区的人群或动物感染谲诈腐霉菌后表现的临床症状不典型。假阳性可出现在健康个体[58]。不能进行培养时，分子生物学方法和免疫组织化学（过氧化物酶和免疫荧光）可以帮助鉴别。直接镜检和组织病理学中出现透明菌丝应该报告提示腐皮病，培养鉴定（在液体培养中产生游动孢子）、分子检测阳性和（或）免疫组织化学染色实验报告作为该病的进一步确证实验。在这种情况下，报告的结果应该包括：“经培养和血清学和（或）分子方法支持确证由谲诈腐霉菌感染引起的腐皮病”。

三、链壶菌和副链壶菌

(一)分类

谲诈腐霉菌目前被认为是卵菌纲中唯一能对哺乳类动物宿主致病的病原菌[3,31]。1999年报道了卵菌纲种属导致致哺乳动物皮肤感染并播散入血的新的病原菌[57]。链壶菌属能感染如蟹类、蚊幼虫、线虫类和其他低等动物[57,65-66]。由于卵菌纲成员能产生菌丝样，在很长时期内它们被认为是“水生真菌类”(水霉菌)。但它们不是真正的真菌，它们现在被划归为SAR超类群(图130-1)[28]。虽然Dick[67]根据表型特征质疑该种属的正确性，但是当前的一项系统发育研究发现感染狗的与来自蚊子幼虫的 *L. giganteum* 是群生的[68]。这一发现表明链壶菌的分类仅仅基于形态学是不确定的。最近至少有3种病原体被报道：在美国感染狗的 *L. giganteum*，在美国感染猫的 *L. deciduum* (*L. vielae*)和在泰国造成人角膜炎的 *L. Albertoi*[69-70]。此外，基于系统发育学分析，从患病狗取出的一些菌株被认为属于副链壶菌属[70]。

(二)特征描述

链壶菌在临床实验室用分离真菌的培养基很容易被分离出[57,66]。这点与本章节其他病原菌不同。链壶菌在SDA上37 ℃下生长良好，25 ℃下生长缓慢。在37 ℃环境中培养至少24 h后生长为黄白色无气生菌丝内生型菌落(图130-4a)。根据密歇根大学的研究数据，链壶菌种形成8～15 μm的带状菌丝和直径20～45 μm的球形结构[68-69](图130-4b)。在液体培养基中，未分化的菌丝可以在其顶端形成一个囊泡。该囊泡随着原生质物质的不断进入而逐渐变大，并在随后的20 min内形成游动孢子。感染狗的 *karlinii* 副链壶菌、来自狗的耐热型 *L. giganteum* (不同于来自蚊子的热敏感型 *L. giganteum*)、来自猫的 *L. deciduum* 和泰国患者感染的 *L. albertoi*，这些是已知的感染哺乳动物的病原体[68-70]。该菌种在培养中是否存在有性结构(卵原细胞)仍未见报道。

(三)流行病学和传播

迄今为止，在美国已经报道许多有关哺乳动物宿主的链壶菌病病例[65-66]。近来报道了1例泰国患者感染链壶菌种引起角膜炎[48]。研究者对澳大利亚1只患有链壶菌病的狗进行了研究(数据未出版)。美国已报道的链壶菌病发生地区与谲诈腐霉菌的感染地区相同(见下文)[62,65-66]。这些地区包括墨西哥湾和阿肯色州的边境，佐治亚州，伊利诺伊州，印第安纳州，马里兰州，北卡罗来纳州，南卡罗来纳州，田纳西州和弗吉尼亚州等。链壶菌种在潮湿的环境中可能会利用低等动物宿主或植物完成其生命周期。有开放性皮肤损伤的哺乳动物进入被污染的环境中暴露于这些菌种产生的游动孢子，并能导致链壶菌病。宿主间的传播还未被发现。在小鼠身上进行的实验性感染未取得成功[58]。

(四)临床意义

副链壶菌属、链壶菌属和谲诈腐霉菌被认为是新出现的病原性卵菌纲，可感染浸润浅表、皮肤、皮下和血管[31]。这些病原菌还可导致全身性感染。在人和动物中常见的感染部位有角膜、胃肠道、淋巴和其他的解剖部位[48,66]。哺乳动物病原菌链壶菌只在3个地区被报道(见上文)，但是其他热带和亚热带地区也存在该菌种。

(五)标本采集、运送和储存

见本章谲诈腐霉菌的相关小节。

(六)直接检测

显微镜检查 活检组织切成5 mm的小块，病灶的刮片制成湿片，细胞学样本采用吉姆萨染色以观察感染组织的链壶菌种的菌丝形态。链壶菌病病例的湿片中可以发现宽9～18 μm，分枝状，少分隔的菌丝(较谲诈腐霉菌的稍宽)(图130-4c)。在病理组织切片中很难区分副链壶菌，链壶菌和谲诈腐霉菌的菌丝。两者都能引起嗜酸性粒细胞肉芽肿(图130-4d,e)，虽然副链壶菌和链壶菌的菌丝较谲诈腐霉菌的稍大，但是明确诊断只能依据培养(图130-4a)(见谲诈腐霉菌的相关章节)或者用分子技术。在HE染色中可轻松观察到来自嗜酸性真菌的菌丝元素(毛霉门和虫霉门)。但是用这种染色剂很难发现卵菌门[31,34]。推荐在链壶菌病或副链壶菌病的情况下使用GMS染色剂(图130-4d)。引起狗链壶菌病的部分链壶菌种的镜下特点主要有一些椭圆形和圆形结构，其形态特点在实验室可以用来区分哺乳动

物致病性卵菌纲(图 130-4b)。然而一些其他链壶菌哺乳动物病原菌缺少这些特点,因此,不能单一依据形态明确区分这 2 种生物。

(七)分离、鉴定和分型系统

Vilela[53]等发现致病性链壶菌和副链壶菌菌种,包括真菌病原体如蛙粪霉属、耳霉属和毛霉属,在培养物中并未利用蔗糖,而谲诈腐霉菌在含有蔗糖的培养基上呈蔗糖阳性。作者建议在临床实验室中使用这项简单的测试区分真菌和真菌样病原体[53]。

(八)血清学和 DNA 试验

ELISA 和免疫印迹的方法已经用于人和低等动物的链壶菌病检测[57]。虽然 2 种方法都是检测链壶菌病的病例中是否存在抗体,但是免疫印迹方法很难解释观察到的抗原条带,而且 ELISA 与谲诈腐霉菌的抗原有很强的交叉反应。尽管有这些缺点,ELISA 仍被建议用于监控治疗的反应,因为抗链壶菌抗体的下降可认为是治愈病例[57]。已有用于鉴别菌株及活检组织中链壶菌属的菌丝的特定引物[57-58]。但是其特异性未知。

(九)抗菌药物敏感性试验

正如前文所述,卵菌纲在几个方面不同于真正真菌,其中之一就是卵菌纲的细胞质膜缺少固醇。因此腐霉菌属种和链壶菌种对大多数以固醇为靶标的抗真菌药是天然耐药的。然而,及时准确的诊断对控制感染是必不可少的。已有研究对人和低等动物中分离的链壶菌进行体外真菌药敏试验[62]。遗憾的是,在体内的效应却是相反的结果。

(十)结果的评价、解释和报告

培养阳性的链壶菌病病例,须通过镜检观察典型结构特点来进一步验证(图 130-4a)。如果该菌株不呈现分生孢子,必须进行游动孢子的诱导[31,33]。孢子囊和双鞭毛游动孢子的形成可作为卵菌纲的确证证据。迄今为止,还未有卵菌纲是实验室常见污染菌和人或低等动物正常菌群的报道。除此之外,源自实验菌株的基因组 DNA 应该用分子生物学方法检测(见上文)以进一步证实该结果。病例的报告应包括以下几方面:①湿片和临床染色标本中存在宽的合流菌丝;②阳性培养中游动孢子的形成;③从形态学和 DNA 技术对该菌株的鉴定。

四、西伯鼻孢子菌

(一)分类

阿根廷的 Guillermo Rodolfo Seeber 于 1900 年在他的博士论文中最早报道了 2 例鼻孢子病[1-2],报道称他于 1892 年发现了 2 例鼻息肉患者,其中包含的菌株和 Posadas 于 1892 年的报道相似(球孢子菌病)。他还提到,1892 年 Malbran 研究了一个含有相同形状特征微生物的鼻息肉病例。印度的 O'Kinealy 于 1903 年观察的 1 例鼻孢子菌病病例,在 1905 年由 Minchin 和 Fanthan[2]又进行了详细的研究。这些调查提示该病原菌可能是双相基尼利鼻孢子虫。Seeber 于 1912 年将其改名为西伯鼻孢子菌,因优于基尼利鼻孢子虫取得广泛关注。1923 年 Ashworth[2]声称应该采用由 Minchin 和 Fanthan 提出的鼻孢子菌属,并且基于 Seeber[2]的描述和 Belou 又提出的 *Coccidioides seeberia* 名称,最终双相西伯鼻孢子菌的名字最具优先性。

Vilela 和 Mendoza[71]对部分研究者没有培养病 原菌而提出的极端假设进行了批判。近期大量相似的研究结果认为在 *Microcystis* 属的西伯鼻孢子菌是 *cyanobacterium*。这种观点及其他观点受到个别群体的质疑,他们认为从形态学、细胞周期及系统进化分析法上该病原菌都属于真核原生生物界[71]。西伯鼻孢子菌在 *Mezomycetozoa* 中的定位是一个惊喜。由孤水鱼类和两栖动物的寄生虫组成的拥有球形和内生孢子的群体与西伯鼻孢子菌极其相似[1,5],最近发现这种病原体是超类群 *Opisthokonta* [*Ichthyosporea* (*Mesomycetozoea*)]的一部分[28]。最近利用核糖体 DNA 内部转录间隔区(ITS)发现西伯鼻孢子菌可能包含一些代表新物种的特异性菌株[72]。

(二)特征描述

该异常病原菌不易培养,因此它的形态学特征只能通过体内显微技术和超显微技术进行研究[1-2,5]。在感染组织中,西伯鼻孢子菌具有复杂的细胞寄生周期,在不同的发展阶段看似具有孢子囊样的多重球形结果(cysts in most mesomyce-

tozoans)(图 130-5A，B*)。大量的椭圆形或圆形内生孢子，直径 7～15 μm，通过成熟孢子囊上形成的小孔进行释放，标志着体内生命周期的开始。这些内生孢子慢慢变大并且逐渐从幼稚(juvenile sporangia，JS)(10～100 μm)发展到中间体(intermediate sporangia，IS)(100～150 μm)，再到成熟孢子囊(mature sporangia，MS)(150～450 μm以上)(图 130-5A)。孢子囊释放内生孢子，然后一定程度上再次激发体内周期。虽然孢子囊直径被用于鉴定体内阶段，但成熟孢子囊由于其发育良好的内生孢子的存在而异于其他阶段(图 130-5B)。组织学标本中可观察到部分孢子囊的有丝分裂象[73]。研究者发现中间孢子囊内的细胞核分裂时不伴胞质分裂。含有细胞核的大孢子囊内的内生孢子周围形成细胞壁，之后形成成熟孢子囊。最近，Delfino 等[74]使用共聚焦显微镜和 DAPI(4′,6-二脒基-2-苯基吲哚)染色，确认了先前关于西伯鼻孢子菌核分裂同步性的观点[73](图 130-5C)。

(三)流行病学和传播

鼻孢子菌病通常发生在除了澳大利亚的热带和亚热带地区[1]，虽然感染首次在阿根廷被发现，但印度和斯里兰卡发病率却最高[1,74]。鼻孢子菌病在其他地区如美国以及非洲、欧洲和亚洲国家包括中亚偶有发生。由于一些鼻孢子菌病发生在干旱地区，尤其是沙尘暴之后，该病原菌的亲水性一直存在疑问[1-2,74]。分析该种疾病患者的病例，人们发现鼻孢子菌病是通过接触被西伯鼻孢子菌污染的水源感染的。然而，通过自然环境感染的具体机制尚不清楚。

水生鱼类和两栖动物的水生病原菌与西伯鼻孢子菌之间的关系趋向于证实它的亲水性[5-7,74]。最可能的是该病原体通过抗性孢子的形成，由水生环境进化到陆生环境。正如西伯鼻孢子菌所处的 Dermocystida 里的其他成员一样，游动孢子的形成是很有可能的情况，但仍未被证实，其中西伯鼻孢子菌位于系统进化区域[1-2,6,75]。该种疾病为散发病例，但在美国佛罗里达斯旺和塞尔维亚出现两例鼻孢子菌病的暴发流行[77-78]。存在于水和土壤里的抗性孢子通过皮肤或黏膜小创口进入人体导致感染。虽然正常人罹患该病，但一些研究者认为它与职业和社会条件具有相关性[1,75]。导致该病的易感因素尚不明确。用于诱导该病的动物实验，以及其在宿主间的传播有待进一步研究。

(四)临床意义

除了人类，其他一些动物的面部鼻孢子囊病也有报道，包括牛、猫、狗、山羊、马、河豚、鸟[1,6]。在人类，最常见的临床表现是在鼻子、眼睛、喉、生殖器及直肠部位黏膜形成无痛息肉。多发性皮肤病灶也有报道[1,75]。该病虽然不致命，但息肉阻塞鼻和喉部时可导致呼吸困难。鼻部息肉常伴鼻漏和出血。大量缓慢生长的椭球状肿块通常是单个或者多个、有梗的(附着在皮肤上)、固定的、易出血的发红病灶；此外，感染部位还常伴瘙痒症状。疾病的鉴别诊断包括与细菌和真菌感染、肿瘤、其他相似的黏膜和皮肤疾病区分。

(五)标本采集、运送和储存

标本的采集、处理、储存和检测标准参见第117章。鼻孢子囊病患者的临床标本通常从感染部位取组织进行活检。由于西伯鼻孢子菌不能培养，临床标本采集后用甲醛固定以便后期组织病理学评估。而新鲜标本应该进行实验室检测以排除其他病原菌以便确认组织病理学的结果。在这些病例中，活检标本应该无菌收集并迅速运送到实验室。如果距离实验室较远，标本采集后应低温(－80～4 ℃)运送和储存。

(六)直接检测

1. 显微镜检查 将采集到的鼻孢子囊病患者标本制成湿片镜检，镜下通常可见成熟和未成熟的球形孢子囊和大量内生孢子。含有内生孢子的成熟孢子囊的囊壁很薄，直径约超过 400 μm。JS 和 IS 孢子囊较小且细胞壁较厚。已有研究发现在仅用水处理的新鲜标本中成熟孢子囊可释放内生孢子[6]。最近有学者推荐净化系统用于研究西伯鼻孢子菌的表型特征[1]。样本涂片吉姆萨染色或革兰染色可发现西伯鼻孢子菌孢子囊和内生孢子(图 130-5D)，用荧光显微镜可观察到西伯鼻孢子菌的球形未着色部分产生的自发荧光。

---

*译者注：原著引用其他著作图，未经原作者授权翻译，故此保留原图

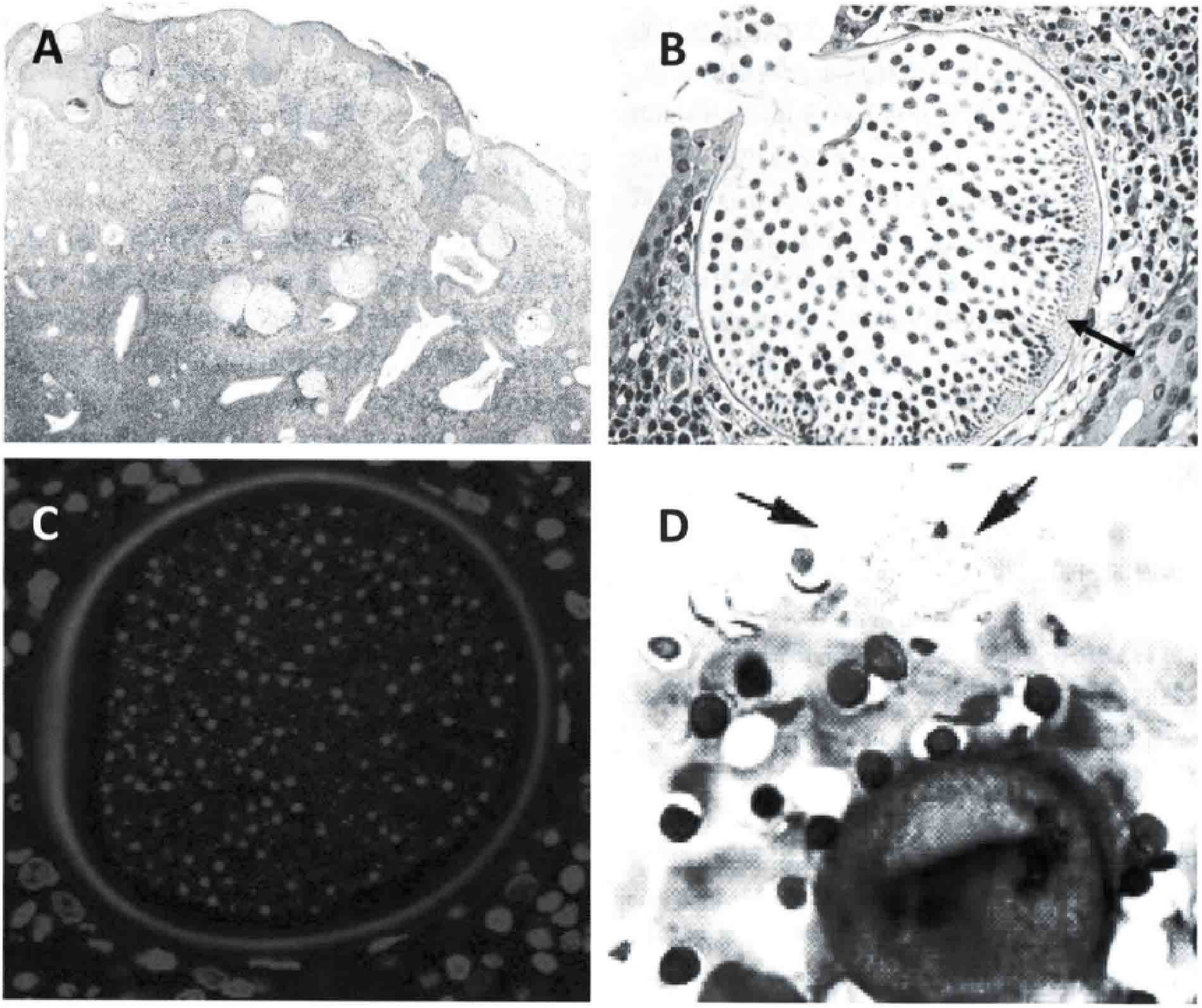


图 130-5 R. seeberi. (A) H&E-stained tissue sample from a nose polyp showing MS with endospores and JS of different sizes. Magnification, ×10. (B) Release of endospores from an MS. Note the presence of small endospores arising from the opposite site of the exit pore (arrow). Magnification, ×40. (C) Confocal microscopy of a tissue sample containing the R. seeberi parasitic stage stained with DAPI and actin dyes, showing an immature sporangium (74). Note the presence of multiple nuclei and the binding of the actin probe to the layer below the cell wall. Magnification, ×40. Courtesy of Delfino et al. (74). (D) Wright-Giemsa impression smear from a dog with nasal rhinosporidiosis. An immature collapsed sporangium may be observed in the lower section. Numerous endospores surrounded by a clearhalo are shown near the top (arrows). Magnification, ×70. Courtesy of W. A. Meier.

虽然 mesomycetozoan 病原菌的寄生球形结构用 HE 染色非常好,但也能用 GMS 和 PAS 染色,过去很多人根据这一特征认为西伯鼻孢子菌可能与真菌界有某种相关性。息肉样病变组织病理切片用 HE 染色后常可见大量处在不同发展阶段的孢子囊(图 130-5A,B)。感染的主要特征是黏膜和(或)皮肤伴含大量孢子囊的纤管组织和纤维结缔组织增生。当发生鼻部、眼睛和皮肤感染时,通常能够观察到淋巴细胞、中性粒细胞、浆细胞,以及少见的巨细胞和嗜酸性粒细胞的炎性浸润。JS 和 IS 具有一个中央核和明显的核仁[73-74]。缺陷型孢子囊的瓦解可能导致 U 型结构的形成。有些黏膜上皮细胞附近能够发现拥有大量内生孢子的成熟孢子囊,在黏膜上皮细胞,它们通过经皮消除现象(图 130-5A,B)从内部感染区进行转运[75]。成熟孢子囊的细胞壁通常很薄,并且包被的内生孢子可能含有成簇的、直径 1～3 μm 大小的淡红色球形囊泡。内生孢子外有黏

液样荚膜，HE 染色不着色。由于选取组织切面的不同，研究孢子囊壁上可能观察到一个微孔（图 130-5B）。

2. 临床标本的核酸检测

目前，对于西伯鼻孢子菌的诊断，尚没有基于 DNA 的检测技术。

（七）病原体分离、鉴定和分型

尽管大量的报道声称通过培养分离到了西伯鼻孢子菌，但这些报道可靠性尚待验证。已经证实的是绝大多数源于鼻孢子囊病患者培养出的微生物是污染的真菌或细菌[1,75]。因为西伯鼻孢子菌无法培养，该菌的鉴定只能依靠其形态学特征分析，如湿片镜检和（或）组织病理学分析。在感染组织中发现典型的形态学特征基本上可确诊西伯鼻孢子菌的感染，但是最终的诊断应综合考虑该菌的流行病学特征和感染的临床特征。形态学上，粗球孢子菌（*Coccidioides immitis*）和波萨达斯球孢子菌与形成内生孢子的西伯鼻孢子菌感染的孢子囊期相似。但是根据以下 3 个特点易将球孢子菌属与西伯鼻孢子菌区别开来：①西伯鼻孢子菌的孢子囊直径大小（4～400 μm）；②球孢子菌病的流行病学特征、临床表现和系统发育特征；③球孢子菌属易被培养。

（八）血清学试验

尽管早期研究发现利用内生孢子或孢子囊作为抗原时未能从患者血清中检出西伯鼻孢子菌抗体，但是这并意味着患者血清中不存在抗体，有研究者就认为以前抗体检测失败的原因在于检测方法不够敏感，如免疫扩散法。当使用更为灵敏的免疫电镜技术后，人们首次发现抗西伯鼻孢子菌抗体与鼻孢子囊病患者血清中成熟孢子囊发生特异性抗原发生反应[1,75]。除此之外，临床上暂时还没有其他鼻孢子菌病的血清学诊断方法。

（九）抗菌药物敏感性试验

西伯鼻孢子菌对多数抗真菌药物具有耐药性[1,75]。对某些病例研究发现氨苯砜能够控制病情[1]。由于该菌不能分离培养，故无法进行药敏试验。此外，通过外科手术切除感染的组织也是治疗的一种方法，但是复发很常见[1,75,79]。

（十）结果的评价、解释和报告

鼻孢子菌病患者在感染的不同阶段均可检出病原体的球形结构；患者的病理组织切片样本经吉姆萨染色、革兰染色和制备湿片均可见大量的内生孢子。由于西伯鼻孢子菌的球形结构和内生孢子与球孢子菌属感染的寄生阶段相似，因此，需建立一种鉴别试验来区分，这在球孢子菌病流行的地区尤为重要。当检出直径＞300 μm 的球形孢子囊且同时伴有内生孢子，即使培养阴性，也可确证为鼻孢子菌病。检验报告还应包括不易被培养出的典型球形结构。

参考文献请扫二维码查阅

第131章 微孢子菌

RAINER WEBER, PETER DEPLAZES, ALEXANDER MATHIS

（宁永忠 译；杜艳、陆玲 审校）

一、分类

微孢子菌（*Microsporidia*）是一类专性细胞内寄生的单细胞、能形成孢子的真核生物。迄今已从各大动物群中发现的致病性微孢子菌有超过200个属、约1500种[1-7]。其中9个属能感染人类，包括*Anncaliia*属、脑炎微孢子菌属（*Encephalitozoon*）、内网微孢子菌属（*Endoreticulatus*）、肠微孢子菌属（*Enterocytozoon*）、微粒子菌属（*Nosema*）、多孢微孢子菌属（*Pleistophora*）、气管普微孢子菌属（*Trachipleistophora*）、*Tubulinosema*和条纹微孢子菌属（*Vittaforma*），以及另将尚未分类的微孢子菌统称为微孢子菌属（*Microsporidium*）（表131-1）（译者注：该微生物在本书已经归类于真菌。本版译者和审稿专家同意改虫为菌，具体菌种也相应调整。上一版翻译是"虫"）。

表131-1 人致病性微孢子菌种类及其临床表现

微孢子菌种类	临床表现	
	免疫受损患者	免疫正常患者
Anncaliia algerae[a]	肌炎、结节性皮肤病变	角膜炎、声带感染、肌炎
Anncaliia connori[b]	播散性感染	无报道
Anncaliia vesicularum[c]	肌炎	无报道
兔脑炎微孢子菌（*Encephalitozoon cuniculi*）	播散性感染、角膜结膜炎、鼻窦炎、支气管炎、肺炎、肾炎、肝炎、腹膜炎、肠道感染、脑炎、心内膜炎	脑炎
海伦脑炎微孢子菌（*Encephalitozoon hellem*）	播散性感染、角膜结膜炎、鼻窦炎、支气管炎、肺炎、尿路感染	可能导致腹泻
肠脑炎微孢子菌（*Encephalitozoon intestinalis*）[d]	慢性腹泻、胆管疾病、鼻窦炎、支气管炎、肺炎、肾炎、骨感染、结节性皮肤病变	自限性腹泻、无症状携带者
内网微孢子菌属（*Endoreticulatus* spp.）	无报道	肌炎、播散性感染
比氏肠微孢子菌（*Enterocytozoon bieneusi*）	慢性腹泻、消耗综合征、"AIDS相关胆管病变"、胆管炎、无结石胆囊炎、慢性鼻窦炎、肺炎	成人儿童自限性腹泻、旅游者腹泻、无症状携带者
非洲微孢子菌（*Microsporidium africanum*） 锡兰微孢子菌（*M. ceylonensis*）[e]	无报道	角膜溃疡、角膜炎
眼微粒子菌（*Nosema ocularum*）	无报道	角膜炎
具褶微孢子菌属（*Pleistophora* sp.） 罗纳菲具褶微孢子菌（*Pleistophora ronneafiei*）	肌炎	无报道
嗜人气管普微孢子菌（*Trachipleistophora anthropophthera*）	播散性感染（包括大脑、心脏、肾脏）、角膜炎	无报道
人气管普微孢子菌（*Trachipleistophora hominis*）	肌炎、心肌炎、角膜结膜炎、鼻窦炎	角膜炎

（续 表）

微孢子菌种类	临床表现	
	免疫受损患者	免疫正常患者
Tubulinosema acridophagus	播散性感染、肌炎、肝炎、肺部感染、腹膜感染及皮肤感染	无报道
角膜条纹微孢子菌(*Vittaforma corneae*)[f]	播散性感染、尿路感染	角膜结膜炎
尚未分类的微孢子菌属	隐匿性感染、胶原交联引起的角膜炎	反应性关节炎

注：[a] 以前为 *Brachiola algerae*、*Nosema algerae*；[b] 以前为 *Brachiola connori*、*Nosema connori*；[c] 以前为 *Brachiola vesicularum*；[d] 以前为 *Septata intestinalis*；[e] 微孢子菌群属(*Microsporidium*)是一群因已知信息不足而未进行分类的微孢子菌的总称；[f] 以前为 *Nosema corneum*

微孢子菌只能在宿主细胞内生长，离开宿主细胞后不能进行新陈代谢。它的生活史(图 131-1)包括分裂体增殖期(merogonic sequence)、孢子形成与发育期(sporogonic sequence)，最终形成对环境有抵抗力的含有独特结构的成熟孢子。成熟孢子有一种管状外排器[极管(polar tube)]，能将感染性孢子内容物[孢原质(sporoplasm)]注入宿主细胞[8]（译者注：merogonic/merogony 与 sporogonic/sporogony 有相似词尾，中文译名也应该有对应。建议分别译作“分裂体增殖”和“孢子体增殖”。meront 与 sporont 建议译作“分裂体”和“孢子体”。翻译正文用词遵照国内传统翻译。merogonic 与 sporogonic 分别为“分裂体增殖”“孢子形成和发育”；meront 与 sporont 分别为分裂体、母孢子）。

微孢子菌是真正的真核生物，因为具有膜包裹的细胞核、细胞质内膜系统及有丝分裂纺锤体(mitotic spindles)参与的染色体分离过程；但又是特殊的真核生物，因为它们含有细菌样核糖体，无可识别的线粒体，无过氧化物酶体，简单的囊泡状高尔基体膜。与其他真核微生物相比，微孢子菌的基因组较小而且复杂度较低[9-10]。微孢子菌的基因组大小介于 2.3～19.5 Mbp，染色体数量为 7～16 条[11]。微孢子菌基因组的紧凑性源自基因丢失，编码与非编码序列的减少，基因组结构的重组及基因功能的进化[12-15]。

由于显微研究未能发现线粒体，微孢子菌曾被认为是一种在线粒体内共生出现之前分化而来的“古”原生生物(“ancient” protists)[16]。然而，在兔脑炎微孢子菌(*Encephalitozoon cuniculi*)中识别出与线粒体功能相关的基因[9]，线粒体热休克蛋白 70 的免疫定位显示人气管普微孢子菌(*Trachipleistophora hominis*)中存在名为纺锤剩体(mitosome)的具双层膜的微细胞器[17-18]。全基因组序列及同线性分析(synteny analyses)结果显示，微孢子菌门属于真菌界[19]，是由位于真菌系统进化树最早分枝上的内寄生壶菌祖先进化而来[20-21]。最近，有人提出微孢子菌门与隐真菌门(Cryptomycota)相关[22]并且可归于[23]该门[24-25]，该门从遗传角度属于中间型真菌(intermediate fungal forms)。此外，该类微生物的结构特点，比如在孢子壁中存在几丁质、双核及与核包膜有关联的高电子密度纺锤体斑，表明真菌与微孢子菌之间可能存在关联。但微孢子菌有独特的生活史，这与其他真菌物种并不相同。

二、属和种的描述

微孢子菌种类见表 131-1 和图 131-1。*Anncaliia* 属以双核形式存在，通过与宿主细胞质直接接触而发育。此外，它可产生高电子密度的胞外分泌物和泡管状附属物(vesiculotubular appendages)。根据新的超微结构和分子生物学数据，3 个曾属于 *Brachiola* 属的人致病性物种重新归类为 *Anncaliia* 属[26]。*Anncaliia vesicularum*(旧名为 *Brachiola vesicularum*)通过双孢子母细胞增殖(Disporoblastic sporogony)可产生大小为 2.5 μm×2 μm 的双核孢子，内含 7～10 圈螺旋盘绕的非等直径极丝，呈 1～3 行排列，通常为 2 行[27]。基于双核、双孢子母细胞增殖、泡管分泌物形成这些特征，在人类感染中发现的 *Nosema connori* 和 *Nosema algerae* 重新归类为 *Anncaliia* 属。*Anncaliia connori* 的孢子大小为(2.0～2.5) μm×(4.0～4.5) μm，内含 10～12 圈螺旋盘绕的极管[28]。*Anncaliia algerae* 的孢子大小为(3.7～5.4) μm×(2.3～3.9) μm，内含 8～11 圈盘绕的极管[29]。

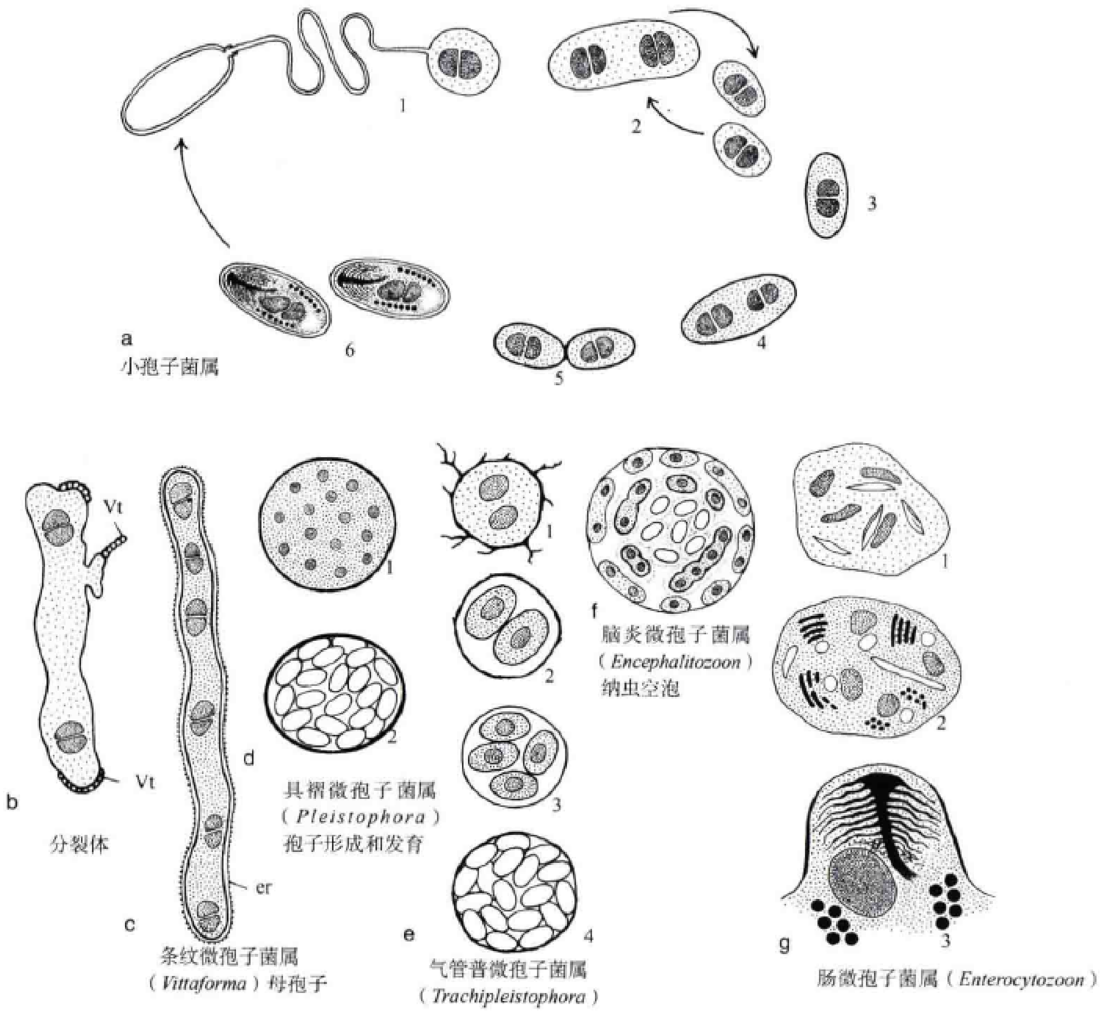


图 131-1 微孢子菌一般生活史及已知可感染人类的属的鉴定特征

注:图中标识为颜色较浅的圆点表示其处于分裂体增殖期(merogonic stage),标识为颜色较深的圆点表示其处于孢子发育期(sporogonic stage),无圆点的表示其为孢子和孢原质(sporoplasm)。a. 以微粒子菌属(*Nosema*)为例图示的微孢子菌基本生活史。一般可在与宿主细胞细胞质直接接触后(微粒子菌属、*Anncaliia* 和肠微孢子菌属)、由宿主细胞膜(条纹微孢子菌属和脑炎微孢子菌属)或病原体的囊样孢子体空泡(具褶微孢子菌属和气管普微孢子菌属)包裹隔离后开始发育。1. 孢原质(sporoplasm):感染期,由孢子产生。根据属种不同,可能有不成对核(单核)或相互靠近并列着的两个核(双核)。2. 分裂体分裂期(merogony):增殖期。可能有简单的细胞质膜,但在 *Anncaliia*,具褶微孢子菌属(*Pleistophora*)和气管普微孢子菌属(*Trachipleistophora*)仍可存在表面被膜。以二分裂或多分裂方式分裂为 2 个或多个。3. 母孢子(sporont):孢子体增殖(sporogony)的第一个阶段。在此阶段出现之前,表面被膜会增厚(肠微孢子菌属的该阶段有延迟)。4. 孢子体增殖(sporogony):持续分裂,最终产生孢子。以二分裂或多分裂方式产生孢子母细胞(sporoblast)。5. 孢子母细胞(sporoblast):孢子体增殖(sporogony)的终末产物,最终发育成熟为孢子。6. 孢子:便于传播而有抵抗力的阶段。孢子以具有将孢原质导入宿主细胞的外排器(极管)为特征。极管是等直径的(等径极丝)或直径在螺旋盘绕的最末端减小(不等径极丝)。(b~g)属的鉴定特征。b. *Anncaliia* 属:该属成员为双核,双孢子产孢体;生活史与微粒子菌属类似,但分裂体形状奇特,表面有被膜,伴有嵌入或突出被膜的泡管状结构(vesiculotubular structures, Vt)。c. 条纹微孢子菌属(*Vittaforma*):该属成员为双核,多孢子产孢体;生活史的所有阶段,包括孢子阶段,均被隔离在一个紧密贴身的、镶嵌有核糖体的宿主细胞内质网(endoplasmic reticulum,ER)网槽内。d. 具褶微孢子菌属(*Pleistophora*):该属成员为单核,多孢子产胞体;分裂体和母孢子期为多核阶段,称为原形体;在分裂体和母孢子上已存在一层厚厚的表面被膜(1);被膜从孢子原形体分离形成囊样孢子体空泡,原形体在泡内分裂产生数量众多的孢子(2)。e. 气管普微孢子菌属(*Trachipleistophora*):该属成员为单核,多孢子产胞体。分裂体表面被膜有分枝状凸起(1);当被膜分离形成围绕单核母孢子的孢子体空泡时,分枝状凸起会消退;母孢子经过系列二分裂形式分裂(2 和 3),最终形成由空泡包封的数量众多的孢子(4)。f. 肠微孢子菌属(*Enterocytozoon*):该属成员为单核,双孢子或四孢子产孢体;生活史的所有阶段,从孢原质注入开始,可在宿主细胞液泡(纳虫空泡,parasitophorous vacuole)中同步存在。分裂体增殖期紧贴着液泡壁,孢子体增殖阶段呈游离状态,液泡最终挤满孢子,以致它表面看起来像孢子体空泡。g. 肠微孢子菌属(*Enterocytozoon*):该属成员为单核,多孢子产孢体;分裂体(1)细胞核形状不规则,有半透明裂隙;母孢子(2)为多核,核呈圆形,极管前体的高电子密度盘是其特征性结构;所有孢子细胞器均过早形成,以致围绕一组细胞器和一个细胞核的收缩(3)可以直接产生近乎成熟的孢子。表面被膜仅在收缩过程中沉积形成

脑炎微孢子菌属(*Encephalitozoon* spp.)在细胞内含有被膜的纳虫空泡(parasitophorous vacuoles)中发育,据推测被膜源自宿主细胞。细胞核在发育各阶段都不成对。分裂体(meront)不断以二分裂方式重复分裂,位置靠近空泡膜。母孢子(sporont)可在空泡中央自由活动并分裂成2～4个孢子母细胞(sporoblast),随后发育成熟形成孢子。孢子大小为(1.0～1.5) μm×(2.0～3.0) μm,其极管由4～8圈等直径极丝螺旋盘绕而成。

在确定导致人类感染前,兔脑炎微孢子菌(*Encephalitozoon cuniculi*)已从一系列动物中分离得到。从人体分离到的3种脑炎微孢子菌(*Encephalitozoon* spp)和从动物分离到的兔脑炎微孢子菌(*E.cuniculi*)在形态学上完全相同。1991年,根据不同的蛋白模式,海伦微孢子菌(*Encephalitozoon hellem*)从兔脑炎微孢子菌中区分开来[30]。*Septata intestinalis* 于1993年被发现,因其独特的形态学而得名,即菌体寄生在宿主细胞内空泡中,其分泌的纤维网状结构包绕着发育中的菌体,使空泡呈隔膜状[31]。随后,根据系统发育分析结果,*S. intestinalis* 重新归类为肠脑炎微孢子菌(*Encephalitozoon intestinalis*)。最后,基于基因分型,鉴定出4株兔脑炎微孢子菌,表现为不同的动物宿主偏好以及地理分布[32-33]。

内网微孢子菌属(*Endoreticulatus*)是从2例感染患者体内分离得到致病菌株,根据其基因分析结果列为新的属种,但其超微结构研究结果尚无报道[34-35]。

肠上皮细胞微孢子菌(*Enterocytozoon bieneusi*)通过与宿主细胞细胞质直接接触而发育(图131-2)。分裂体增殖期和孢子增殖期的形态为圆形的、多核但不成对的原形体(plasmodia),直径可达6 μm。卵圆形孢子大小为(0.7～1.0) μm×(1.1～1.6) μm。用透射电镜横切面观察,源自母孢子高电子密度圆盘的极管有5～7圈等直径极丝螺旋盘绕,呈两行排列[36]。大多数已鉴定的基因型存在着宿主特异性和人畜共患的可能性[37]。

微粒子菌属(*Nosema* spp.)通过直接接触宿主细胞细胞质而发育,细胞核成对(双核),分裂方式为二分裂,母孢子为双孢子产孢体。源自人的唯一种是 *Nosema ocularum*,目前仍保留在这个属内,但可能需要重新归类,然而目前已知的信息并不足以将其重新归类。孢子大小约3 μm×5 μm,有呈9～12圈螺旋盘绕的极管。

多孢微孢子菌属(*Pleistophora* spp.),包含人致病性种 *P. ronneafiei*,细胞核不成对,所有阶段均为多核原形体,可以分裂为更小的多核体片段(multinucleate segment)。分裂体有一层厚厚的无定形被膜,被膜系孢子增殖期从孢子表面分离形成的孢子体样空泡(sporophorous vesicle)。孢子体增殖分裂可产生众多数量不等的孢子,由持续存在的孢子体样空泡包裹。孢子大小(2～2.8) μm×(3.3～4.0) μm,含有9～12圈螺旋盘绕的极管[38]。

人气管普微孢子菌(*Trachipleistophora hominis*)在孢子体样空泡中形成孢子,孢子由重复的二分裂方式产生,而非来自多核原形体。空泡含有2到32个以上的孢子,随孢子数量增加而扩大。细胞核不成对现象发生在各个发育阶段。孢子呈梨形,大小约2.4 μm×4.0 μm,有约11圈直径不等的极丝螺旋盘绕[39]。嗜人气管普微孢子菌(*Trachipleistophora anthropophthera*)形态与人气管普微孢子菌类似,但可观察到2种不同形态的空泡和孢子[40],因此可能具有双相性(dimorphic)。

有2例的遗传学分析[41-42]建议确定为 *Tubulinosema acridophagus*。近期,通过电镜观察也有一例得以证实[43]。超微结构观察显示,所有发育阶段均与宿主细胞胞质直接接触。孢子长1.4～2.4 μm,核为双核,极丝直径不等,有11圈螺旋盘绕,大多为单行排列,在某些孢子中呈双行排列。

角膜条纹微孢子菌(*Vittaforma corneae*),最初分类为角质层微粒子菌(*Nosema corneum*),根据超微结构特征重新归类到一个新属[条纹微孢子菌属(*Vittaforma*)][44]。其细胞核为双核,孢子体增殖由多孢子母细胞形式,母孢子呈带形。所有阶段,包括孢子,均由嵌有核糖体的宿主细胞内质网形成的内胞浆网槽单独包封。孢子大小约1.2 μm×3.8 μm,含有5～7圈螺旋盘绕的极管[45]。

微孢子菌属(*Microsporidium*)是一群因已知信息不足而未进行分类的微孢子菌的总称。锡兰微孢子菌(*Microsporidium ceylonensis*)和非洲微孢子菌(*Microsporidium africanum*)是已划分到微孢子菌属的2种微孢子菌[46]。



图 131-2 感染比氏肠微孢子菌(*Enterocytozoon bieneusi*)的 HIV 感染患者十二指肠上皮细胞的透射电镜显微照片位于肠上皮细胞核与微绒毛边缘之间不同发育阶段的菌体，包括增殖原形体(plasmodium)(1)，后期的孢子体增殖原形体(2)，以及成熟孢子(箭头)。放大倍数 5370 倍(瑞士苏黎世大学附属医院 M. A. Spycher 授权)

三、流行病学和传播

人微孢子菌感染在全球均有记载，在早期的尼安德特人(Neanderthals)标本中也有检出[47]。其感染源和传播方式还不确定，目前认为摄入环境中有高度抵抗力的孢子可能是最重要的传播方式。根据呼吸道和眼部的感染情况，可认为其可通过粉尘或气溶胶传播[48-49]。另外，微孢子菌角膜炎的发生与在温泉水疗沐浴期间和水直接接触有关[50]，水接触被认为是微孢子菌病(Microsporidiosis)的一个危险因素。比氏肠微孢子菌(*Enterocytozoon bieneusi*)、肠脑炎微孢子菌(*E. intestinalis*)和角膜条纹微孢子菌(*Vittaforma corneae*)的同源 DNA 可以在污水、地下水及地表水中检出[51-52]，提示可能存在人畜传播，和人与人之间的传播(anthroponotic transmission)。此外，曾报道过与微孢子菌有关的食源性疾病暴发[52-53]；在新鲜食品生产过程(孢子和 DNA)中[54]及来自奶牛的牛奶标本(DNA)中[55]也检测到人致病性微孢子菌。哺乳动物研究显示，脑炎微孢子菌属(*Encephalitozoon*)可以经胎盘由母亲传给下一代，但尚无人类先天性感染的报道。

微孢子菌直接经动物传播虽未得到证实，但这是有可能的，因为很多微孢子菌种能同时感染人与动物[3]。兔脑炎微孢子菌(*Encephalitozoon cuniculi*)有证据表明是一个人畜共患病原体，在兔、啮齿动物、小绢猴(tamarin)、猫、狗和很多野生动物自然感染检测到的 4 株中，Ⅰ株(兔型株)、Ⅱ株(鼠型株)、Ⅲ株(狗型株)已从 HIV 感染者中分离到[3, 32-33, 56]，Ⅳ株(人型株)已在接受肾移植的患者得以证实[57]，之后也在狗和猫群动物中发现[33]。除已证实能感染人类，脑炎微孢子菌属(*Encephalitozoon*)的各个种已在笼中喂养的鹦鹉、各种野生鸟类，包括城市中的野生鸽子排泄物[58]、墨西哥家养动物[59]、乌干达大猩猩中检出。

从人体中发现的比氏肠微孢子菌(*E. bieneusi*)也能感染各种动物(野生动物、家畜和宠物)。该病原体基因分析显示其有2个主要群组,一个由人源型基因型组成,另一个群组包含动物源性的多种基因型[60-61]。*A. algerae* 是一种可使昆虫致病的微孢子菌,从3个患者体内也分离到了[62-63]。

移植的器官已确认是供体导致微孢子菌感染的感染源。3例移植受者出现神经系统症状,诊断为兔脑炎微孢子菌感染[64];肾移植受者出现不明原因发热、腹泻或无症状蛋白尿和微血尿,诊断为兔脑炎微孢子菌感染、比氏肠微孢子菌感染[65-69]。

四、临床意义

尽管微孢子菌病(microsporidiosis)最常见于HIV感染者,但也可感染其他免疫功能受损及免疫功能正常人群(表131-1)[1,2,4,6,70]。在非HIV感染的免疫功能受损宿主,微孢子菌感染可见于实体器官移植患者[64-65,67]、同种异体造血干细胞移植受者[71-72]、接受单克隆抗体治疗的血液系统恶性肿瘤患者[73]、接受抗肿瘤坏死因子治疗的风湿性疾病患者[74]、老年人[75]和营养不良儿童[76]。对免疫功能正常人群,微孢子菌感染与角膜结膜炎[77-79]、隐形眼镜佩戴者角膜结膜炎[80]、角膜胶原蛋白交联[一种非侵袭性技术治疗锥形角膜(keratoconus)][81]、自限性腹泻[82]和罕见的脑部感染有关[1,64,83-89]。微孢子菌也可以引起潜伏的无症状感染[90]。

微孢子菌病与感染器官的结构和功能异常有关,但不同微孢子菌种的致病机制还没有得到充分了解。严重细胞免疫缺陷患者发展为微孢子菌病的风险最高,T细胞的重要性在无胸腺小鼠实验中也得到证实,但其对微孢子菌感染的免疫机制仍未知[91-93]。发生于免疫功能受损患者的微孢子菌病主要是免疫抑制状态前已经存在的潜伏感染的再激活,还是由新的感染引起,这个问题仍不清楚。

(一)比氏肠微孢子菌(*Enterocytozoon bieneusi*)

比氏肠微孢子菌感染小肠的肠上皮细胞、胆道系统与呼吸道上皮细胞。临床疾病可能由上皮细胞的持续性过度损伤所致。肠微孢子菌属感染可能伴随小肠生理功能的改变,如刷状缘蔗糖酶、乳糖酶和麦芽糖酶活性减弱,以及肠道吸收不良。

比氏肠微孢子菌被认为是最重要的HIV相关肠道病原体之一,其存在于5%~30%伴有慢性腹泻、体重减轻或胆管病变的患者,特别是当$CD4^+$ T淋巴细胞计数低于100/μl时[94]。少数患者可出现上、下呼吸道感染[95],但比氏肠微孢子菌引起的全身性感染还未见报道。病例报道显示,该微生物也是引起器官移植患者腹泻的原因之一[96]。

比氏肠微孢子菌与儿童及免疫功能正常成年人的自限性水样腹泻(可持续2~3周)有关,尤其容易发生于热带地区国家的居民和游客[97]。此外,在热带地区营养不良儿童[76]、有急或慢性腹泻症状(居住在资源丰富的国家)的老年人[75]中也可检出此种微生物。

(二)脑炎微孢子菌属(*Encephalitozoon* spp.)

如报道所说,在人及哺乳动物中,脑炎微孢子菌属(*Encephalitozoon* spp.)能感染上皮细胞、内皮细胞、成纤维细胞、巨噬细胞及其他可能的细胞类型。人脑炎微孢子菌病(encephalitozoonosis)最初在两个癫痫发作儿童患者体内发现[83-84]。随后证实该属微孢子菌可引起脑部感染[1,64,85-89]。出乎意料的是,1例装有双腔心脏起搏器的非免疫功能受损患者诊断为患有兔脑炎微孢子菌(*E. cuniculi*)性心内膜炎[98]。

AIDS患者、器官移植患者及其他免疫功能受损患者中,已知与兔脑炎微孢子菌和海伦脑炎微孢子菌(*E. hellem*)感染相关疾病包括角膜结膜炎、眼内感染、鼻窦炎、支气管炎、肺炎(pneumonitis)、肾炎、输尿管炎、膀胱炎、前列腺炎、尿道炎、肝炎、硬化性胆管炎、腹膜炎、腹泻和脑炎[1,30,56,85]。不同个体的临床表现差异较大,从无症状携带到器官衰竭都可出现。

肠脑炎微孢子菌(*E. intestinalis*)主要感染肠上皮细胞,但在肠固有层中也有发现,并且似乎可以通过受感染的巨噬细胞播散到肾、呼吸道、胆道[31]。肠脑炎微孢子菌所致的慢性腹泻和播散性疾病主要出现在免疫缺陷患者。在1例AIDS患者身上出现肠脑炎微孢子菌所致结节性皮肤感染[99]。此外,在生活在墨西哥的健康儿童和成年人(无论有或无腹泻)粪便标本[100],以及从热带国

家旅游归来的有腹泻症状的游客粪便标本中[101]，均可检测到肠脑炎微孢子菌。

(三)其他微孢子菌

从患有角膜结膜炎、角膜炎、角膜溃疡[79]和反应性关节炎[102]的免疫功能正常人群[1,44]及免疫缺陷人群中[45]分离出不同微孢子菌种(表131-1)。

免疫功能受损患者中，播散性感染和肌炎与多种微孢子菌感染有关(表131-1)，包括具褶微孢子菌属(*Pleistophora* spp.)[103]、罗纳菲具褶微孢子菌(*Pleistophora ronneafiei* spp.)[38]、人气管普微孢子菌(*T. hominis*)[104]、*A. vesicularum*[27]、*A. algerae*[62,105]和 *T. acridophagus*[41-42]。从一位患有急性淋巴细胞性白血病男孩的红斑性皮肤结节中分离到 *A. algerae*[106]。另外，泰国一名健康男性诊断患有内网微孢子菌属(*Endoreticulatus* spp.)感染引起的肌炎[34]。

在早期有癫痫症状的 AIDS 患者的脑、心、肾、胰、甲状腺、肝、脾、淋巴和骨髓组织的尸体解剖标本中，已鉴定存在嗜人气管普微孢子菌(*Trachipleisthophora anthropophthera*)[107]。在一个4月龄无胸腺男婴尸检中发现由 *A. connori* 引起的播散性感染[28]。

五、标本的采集、运输与储存

肠道致病性微孢子菌的孢子可在经10%福尔马林或乙酸钠-乙酸-福尔马林固定的粪便标本或十二指肠抽吸物、新鲜粪便标本或活检组织标本中检查到。引起播散性感染的微孢子菌孢子通常可在新鲜或固定后的尿沉渣、其他体液(包括痰、支气管肺泡灌洗液、鼻分泌物、脑脊液、结膜涂片)、角膜刮屑或组织中检查到。组织学检查时，组织标本需用福尔马林固定。电镜检查时，首选戊二醛组织固定。采集新鲜(无固定剂)标本可有益于细胞培养和分子鉴定。微孢子菌孢子对环境有抵抗力，如果能够防止干燥，孢子可以保持感染力长达数年[108]。

六、检测

光镜检查是实验室诊断微孢子菌感染最可靠的方法。作为可以引起人体疾病的微孢子菌发育阶段的孢子较小，为1～4 μm，通常可以鉴定。疑似肠道微孢子菌病(microsporidiosis)患者，应先用光镜检查粪便标本，而疑似微孢子菌引起的全身感染，最好检测尿沉渣或其他体液标本。微孢子菌不同属种的进一步鉴定需用电子显微镜，最好是遗传学分析[4,6,108]。

(一)粪便标本检查

1. 涂片制备、染色、显微镜检查 制备涂片时用10～20 μl 未浓缩粪便均匀涂抹到载玻片上形成薄薄一层。大多数适用于虫卵或寄生虫(如蠕虫卵、原虫)浓集的处理程序都不能用于浓集微孢子菌孢子。虽然福尔马林-乙酸乙酯(formalin-ethyl acetate)浓集法和几种不同的漂浮浓集法(flotation method)可以去除绝大部分粪便残渣，用这些浓集物制片也更易用光镜读片，但检测的敏感性会下降[109]。

最常用的染色剂是铬变素衍生的各种染色剂[109]和化学荧光增白剂[110-111]，包括钙荧光白(calcofluor white)和其他化学荧光染色剂。无论采用哪种染色技术，阳性对照是必不可少的。检测微孢子菌孢子时需要足够的亮度和放大倍数，如放大630×或放大1000×(油镜)。根据肠微孢子菌属孢子(1.0～1.5 μm)和脑炎微孢子菌属(*Encephalitozoon*)孢子(2～3 μm)在大小尺寸上的差异，采用光镜检查粪便标本可将它们暂时(tentative)鉴定到属。

2. 铬变素染色方法 用铬变素染色剂(chromotrope)染色时，微孢子菌孢子为卵圆形，具有特异性外观(图131-3和图131-4c)[109]。染色后孢子壁呈明亮桃红色，孢子呈透明状或显示有明显的桃红色带状条纹，将孢子呈对角线样或环形束缚。粪便标本中大多数背景残渣复染为淡绿色(或蓝色，取决于不同染色方法)。其他一些粪便成分，比如寄生虫孢囊[如环孢子虫属(*Cyclospora*)]、酵母菌和某些细菌，也会染成淡红色，可根据大小、形状和染色模式将它们与微孢子菌孢子区别开来。

有人对铬变素染色方法进行了改进[109]，包括复染剂的调整、标准铬变素染色液温度及染色时间的改变[112]。现已开发了使抗酸的隐孢子虫卵囊及微孢子菌孢子在同一张载玻片上显色的抗酸

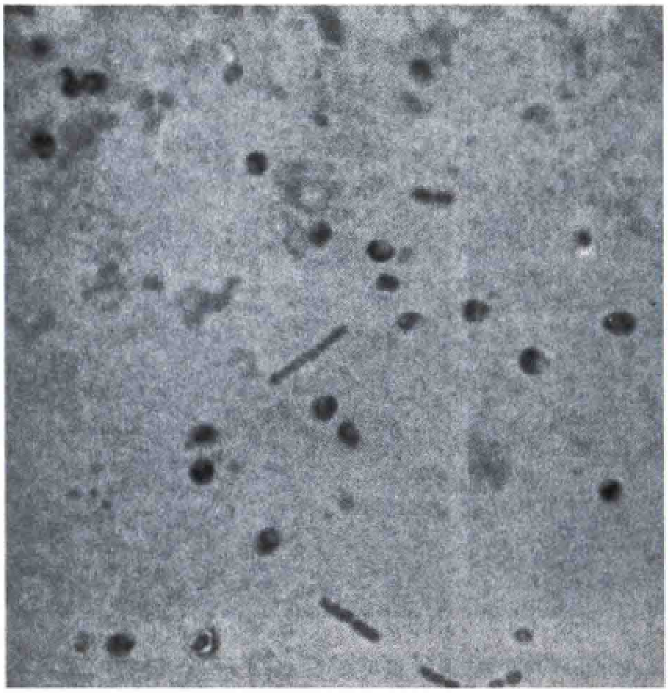


图 131-3　一个伴慢性腹泻的 AIDS 患者粪便标本涂片
图示桃红色染色的比氏肠微孢子菌孢子，大小为(0.7～1.0) μm×(1.1～1.6) μm，铬变素染色，放大倍数，×1000(油镜)，见彩插

三色染色法(acid-fast trichrome stain)[113]和"快热(quickhot)"革兰铬变素染色法[114]。

3. 化学荧光试剂　化学荧光增白剂是几丁质染色剂(第 118 章)，需要用荧光显微镜检查。在适当波长光照下，微孢子菌孢子含几丁质的细胞壁会发出明亮的荧光，从而便于孢子的检测。但这种染色是非特异性的，粪便材料中可能存在的小酵母菌细胞，以及其他粪便成分也可能会发光。所以，镜检识别微孢子菌需要一些经验依据。

使用铬变素(chromotrope)染色法和化学荧光增白剂法的流行病学比较表明，用于日常检测时，这两种方法均有较强的实用性，且敏感性大致相同。而某些实验室同时使用两种染色技术，因为铬变素染色法特异性较高，而化学荧光试剂敏感性更高，可产生假阳性结果。

4. 免疫荧光抗体试验　目前已开发抗脑炎微孢子菌属(*Encephalitozoon* spp.)[115]和比氏肠微孢子菌(*Enterocytozoon bieneusi*)[116]的单克隆抗体，其中一些针对粪便标本的试剂已经用于诊断目的的评估。最近出了一个商品化直接荧光抗体试剂盒(Bordier Affinity Products, Switzerland; CE 批准，FDA 还没有批准)。如果以 PCR 为金标准，该试剂盒对比氏肠微孢子菌(*E. bieneusi*)的敏感性和特异性分别是 95.2%、100%；如果以改良三色法为金标准，分别是 100%、99.4%[117]。

(二)细胞学诊断

十二指肠引流液、胆汁、胆道引流液、尿(图 131-4c)、支气管肺泡灌洗液(图 131-4b)和脑脊液标本经 500×*g* 离心 10 min 的离心沉淀物，以及结膜拭子、痰和鼻腔分泌物涂片中可检测到微孢子菌孢子。内镜下获取的十二指肠引流液，经离心染色涂片后显微镜检对诊断肠微孢子菌病(microsporidiosis)有很高的敏感性。由于微孢子菌感染常常累及多个器官，在任何组织或体液中检测到微孢子菌都应对其他部位进行彻底检查。对疑似播散性微孢子菌病患者应该检查尿标本[1, 108]。

(三)组织活检标本和角膜刮片检查

虽然已在十二指肠和回肠末端组织检出肠道微孢子菌，但在结肠组织部分极少发现。可引起播散性感染的各种微孢子菌几乎在每个器官系统中都能发现[1, 6]。

只有经验丰富的病理学家能使用苏木素-伊红(HE)染色等常规技术，持续稳定地鉴定组织切片中的微孢子菌。亚甲蓝-天青Ⅱ-碱性品红(methylene blue-azure Ⅱ-basic fuchsin)或甲苯胺蓝染色的超薄切片检查较为简便。据笔者的经验，将常规石蜡包埋组织切片(图 131-4a)和角膜刮屑[1, 48]进行革兰染色(Brown-Brenn 或 Brown-Hopps)认为是最可靠的、最快速的鉴定 HIV 相关性微孢子菌的方法。微孢子菌孢子革兰染色颜色多变，但仍能够识别是因为呈深蓝色或淡红色，在淡棕黄色的背景下易分辨。也有人首选银染色(Warthin-Starry 染色)[118]、铬变素的染色技术或化学荧光试剂染色。

(四)分子技术

有文献报道了以 rRNA 为靶标的通用泛微孢子菌引物对和属、种特异性引物对及其在肠道微孢子菌感染诊断中的应用[6, 119]。方法已成功用于新鲜粪便标本、福尔马林固定粪便标本、内镜下活检的肠道组织、尿标本及其他体液标本中比氏肠微孢子菌(*Enterocytozoon bieneusi*)及各种不同脑炎微孢子菌(*Encephalitozoon* spp.)的检测和鉴定。Real-timePCR可对粪便标本中的比氏肠微孢

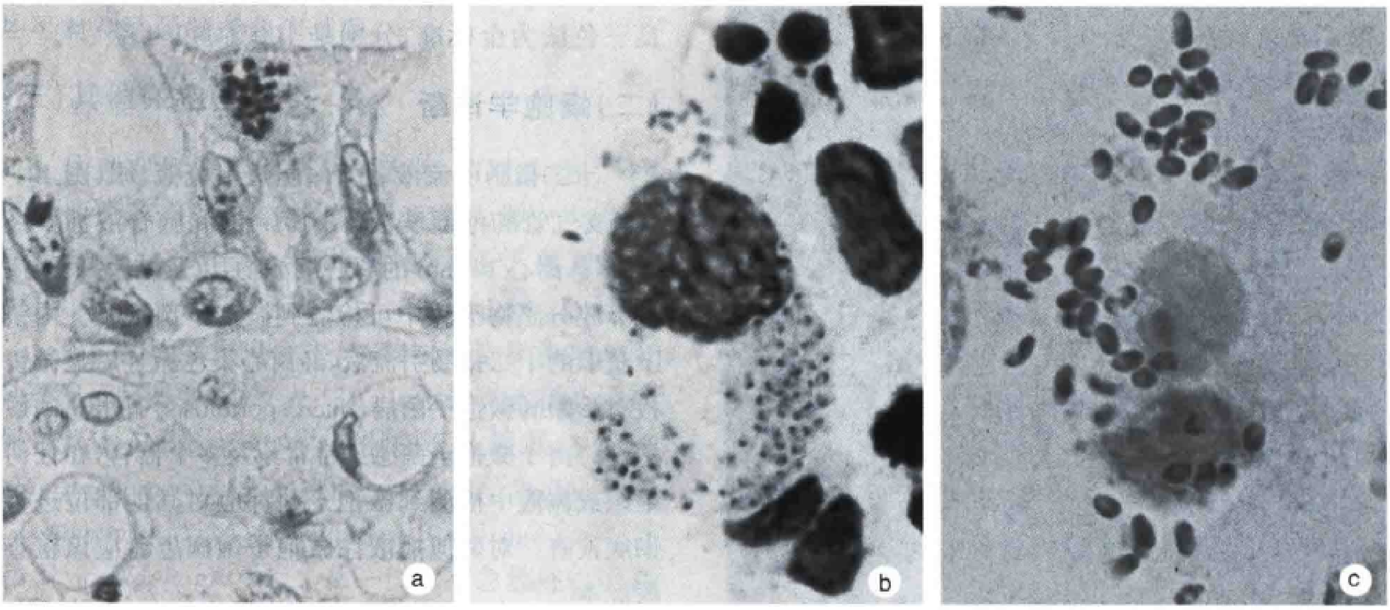


图 131-4 a. 回肠结肠镜检获取的由比氏肠微孢子菌(*Enterocytozoon bieneusi*)感染导致的慢性腹泻 AIDS 患者的回肠末端组织。孢子革兰染色不稳定,大小为(0.7～1.0) μm×(1.1～1.6) μm,位于小肠上皮细胞内核上位置,Brown-Brenn 染色,放大倍数,×1000。b. 比氏肠微孢子菌肠道感染 AIDS 患者的支气管肺胞灌洗液细胞离心涂片显示细胞内的微孢子菌,吉姆萨染色(Giemsa stain),放大倍数,×1000(油镜)。c. 播散性感染兔脑炎微孢子菌(*Encephalitozoon cuniculi*)的 AIDS 患者尿沉渣镜检显示桃红色染色的微孢子菌孢子,大小为(1.0～1.5) μm×(2.0～3.0) μm,铬变素染色,放大倍数,×1000(油镜),见彩插

子菌(*E. bieneusi*)DNA[120]和肠脑炎微孢子菌(*Encephalitozoon intestinalis*)DNA[121]进行定量检测。针对比氏肠微孢子菌(*E. bieneusi*),已经开发出基于环介导等温扩增技术(loop-mediated isothermal amplification technique,LAMP)的试剂盒[122]。目前已开展检测组织切片中比氏肠微孢子菌(*Enterocytozoon bieneusi*)的原位杂交技术[123]。

七、分离

微孢子菌在人工环境下不能生长发育。脑炎微孢子菌属、人气管普微孢子菌(*T. hominis*)、角膜条纹微孢子菌(*Vittaforma corneae*)和 *A. algerae* 可用不同的细胞培养分离,包括 RK-13(兔肾),MDCK(Madin-Darby 犬肾),MRC-5(人胚肺成纤维)细胞及其他细胞[46, 124-125]。目前,仅实现对比氏肠微孢子菌(*E. bieneusi*)的短期体外繁殖。微孢子菌的分离虽与诊断无关,却是重要的研究工具。

八、鉴定

微孢子菌的鉴定及其分类主要以超微结构特征为基础。微孢子菌的超微结构独特,有特异病症性特征(pathognomonic),可以通过超微结构区分所有微孢子菌属(图 131-1)[46]。单一的形态学特征不足以描绘所有人致病性微孢子菌种的特征。3 种脑炎微孢子菌具有大致相同的形态特征,其特性描述需采用基因分析技术,该技术也可以揭示亚型的特异性变异[30, 32]。利用泛微孢子菌引物进行 PCR 扩增产生的基因系列,再进行系统发育分析(phylogenetic)分析能鉴别新的微孢子菌种[3, 6, 23, 45, 119, 124, 126]。

九、血清学试验

血清学试验[包括碳免疫分析(carbon immunoassay)、间接免疫荧光试验、酶联免疫吸附试验和免疫印迹(Western blot)免疫检测]已用于检测几种动物源性兔脑炎微孢子菌(*E. cuniculi*)特异性抗体。由于脑炎微孢子菌属(*Encephalitozoon*)各个属种的孢子壁可能存在交叉反应,这些技术能否用于检测尚存在争议。此外,人体血清学研究显示抗体反应阳性的结果尚未经微生物检测结果所证实。兔脑炎微孢子菌极管重组抗原可提高检测的特异

性，血清学诊断工具认为是可行的[127]。

十、抗菌药物敏感试验

研究发现阿苯达唑可引起脑炎微孢子菌属和条纹微孢子菌属生长发育畸形，导致它们在细胞培养物中繁殖受限或停止繁殖，但不能破坏成熟的微孢子菌孢子，这些孢子仍具有持续感染性[128]。体外研究表明，烟曲霉素（fumagillin）及其类似物 TNP-470、尼可霉素（nikkomycin）Z 和氟喹诺酮可完全或部分抑制脑炎微孢子菌属和条纹微孢子菌属复制或孢子萌发[128-129]。尚无可用于研究比氏肠微孢子菌（*E. bieneusi*）的体外系统。

由于针对人的治疗研究受限，目前，在治疗方面的研究只包括了 2 组随机对照试验[130-131]。阿苯达唑能够使 HIV 相关性脑炎微孢子菌病（encephalitozoonosis）达到临床治愈，阻止孢子外排[130]。一个病例报道表明，阿苯达唑治疗播散性 *Tubulinosema acridophagus* 感染有效[43]。而作为对比，观察报告虽然提示阿苯达唑可改善肠微孢子菌属感染部分患者的临床症状，但不能减少病原体载量，对感染的治疗无效。口服烟曲霉素可以彻底消灭严重免疫缺陷 HIV 感染者[131]、肾移植患者[132]、干细胞移植受者[72]体内的比氏肠微孢子菌（*E. bieneusi*），但可发生严重不良反应[131, 133]。

比氏肠微孢子菌相关性腹泻及脑炎微孢子菌属各种导致的全身感染主要见于严重免疫缺陷患者。通过抗逆转录病毒治疗可改善患者的免疫功能，在清除肠道微孢子菌的同时，会导致全面彻底的临床反应及肠道结构正常化[134]。

微孢子菌角膜结膜炎可能是一种自限性疾病[135-136]，反复擦拭角膜或清创术（debridement）可能会清除菌体[137-139]。另一方面，阿苯达唑的系统性治疗[140]或伏立康唑的局部治疗[141]也有效。

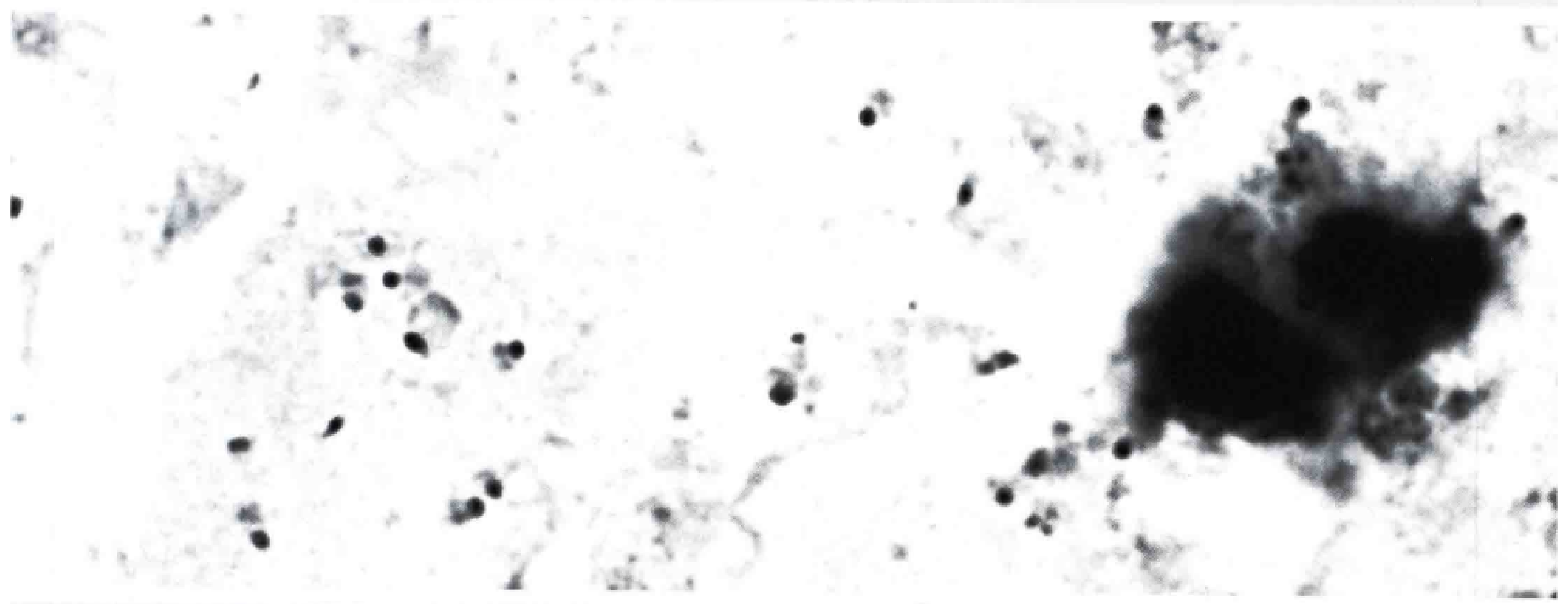
十一、结果的评价、解释和报告

微孢子菌是条件致病性病原体，可感染有严重免疫缺陷的 HIV 感染患者（$CD4^+$ T 细胞计数低于 200/μl）及其他免疫功能受损者，包括器官移植患者。因此，对于这类患者，需重点检查粪便或其他标本，在此类患者的临床标本中检出微孢子菌时，需慎重将其列为致病病原体。此外，多种微孢子菌在免疫功能正常或其他健康人群中可引起自限性腹泻或角膜结膜炎。

光镜检查发现微孢子菌孢子是微孢子菌病的常规诊断方法。光镜检查有一定的敏感性和特异性，但不能将微生物鉴定至属、种水平。大多数病例需通过电镜、PCR 方法及基因测序分析取得属、种水平的鉴定，由于检查的标本量很小及可能有采样误差，电镜检测微孢子菌敏感性相对较差。免疫功能正常患者在粪便、尿中仅排泄少量孢子，因此，目前光镜检查法用于该类人群的微孢子菌检测时并不可靠。

参考文献请扫二维码查阅

第七部分　抗真菌药物和敏感性试验方法



第七部分　抗真菌药物和敏感性试验方法

第 132 章　抗真菌药物*

SHAWN R. LOCKHART，ELIZABETH L. BERKOW

（曹敬荣　译；芮勇宇　审校）

经过长时间的缓慢发展，在过去的十年里，抗真菌药物有了较大发展，引入了新一类重要的抗真菌药物（棘白菌素），通过化学修饰扩大了已有类型药物的活性谱（三唑类），并开发递送现有药物的新方法两性霉素 B 脂类制剂）。这些药物的研发改变了许多侵袭性真菌感染的治疗标准，尤其是曲霉菌病和念珠菌病。本章综述了目前可用于全身给药的 4 类主要的抗真菌药物：丙烯胺类（allylamines）、唑类（azoles）、棘白菌素（echinocandins）和多烯类（polyenes）。表 132-1 总结了主要的全身性抗真菌药物对重要真菌的活性比较。本章也讨论了其他几个可通过口服或注射治疗浅表、皮下或系统性真菌感染药物的特性，此外还简要评述了目前正在进行临床试验的新型药物。

表 132-1　常用全身性抗真菌药物活性谱和活性程度[a]

微生物	抗真菌药物活性[b]								
	两性霉素	氟康唑	艾沙康唑	伊曲康唑	泊沙康唑	伏立康唑	阿尼芬净	卡泊芬净	米卡芬净
曲霉菌属	+++	−	+++	++	+++	+++	++	++	++
皮炎芽生菌	+++	+	+++	+++	+++	+++	−	−	−
念珠菌属									
白念珠菌	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
光滑念珠菌	+++	++	++	++	++	++	+++	+++	+++
克柔念珠菌	++	−	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
葡萄牙念珠菌	++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	++
近平滑念珠菌	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	++
热带念珠菌	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
球孢子菌属	+++	+++	+++	+++	+++	+++	−	−	−
隐球菌属	+++	+++	+++	++	+++	+++	−	−	−
镰刀菌属	++	−	+	+	++	++	−	−	−
荚膜组织胞浆菌	+++	−	+++	+	++	++	−	−	−
毛霉菌	++	−	++	−	++	−	−	−	−
巴西副球孢子菌	+++	++	+++	+++	+++	+++	−	−	−

注：[a]此表是部分全身性抗菌药物对不同真菌活性比较的总体概述。更详细信息建议读者参考有关文本。[b]−．无抗菌活性；+．偶尔有抗菌活性；++．中度抗菌活性但存在耐药；+++．抗菌活性高偶尔出现耐药

*本章包含 Shawn R. Lockhart 和 David W. Warnock 在本手册第 11 版第 129 章中呈现的部分内容

一、丙烯胺类

丙烯胺类是一组合成的抗真菌药物，主要用于皮肤癣菌病的局部和口服治疗，特比萘芬和萘替芬两种药物已经被批准用于临床，萘替芬仅用于局部治疗。

(一)作用机制

丙烯胺类能抑制角鲨烯环氧化酶，此酶是形成麦角固醇的关键酶，麦角固醇是敏感真菌细胞膜中主要的固醇。角鲨烯的蓄积会导致细胞膜破坏及细胞死亡[1]。

(二)特比萘芬

特比萘芬(Lamisil；Novartis Pharmaceuticals)是一种亲脂性药物，可用于口服或局部治疗，被广泛用于皮肤癣菌引起浅部真菌感染的治疗。

1. 活性谱 特比萘芬对下列几组致病真菌具有抗菌活性，包括皮肤癣菌(表皮癣菌属 *Epidermophyton*、小孢子菌属 *Microsporum* 和毛癣菌属 *Trichophyton* spp.)[2-4]和着色真菌[5]。此外，特比萘芬对曲霉菌属(*Aspergillus* spp.)[6]、念珠菌属(*Candida* spp.)[7]、皮炎芽生菌(*Blastomyces dermatitidis*)和荚膜组织胞浆菌(*Histoplasma capsulatum*)[8]、巴西副球孢子菌(*Paracoccidioides brasiliensis*)[9]、马尔尼菲篮状菌(*Talaromyces marneffei*)[10]及申克孢子丝菌(*Sporothrix schenckii*)[8]也具有一定的抗菌活性。

2. 获得性耐药 即使在延长暴露后，也罕见皮肤癣菌对特比萘芬产生耐药的情况。

3. 药物动力学 特比萘芬口服吸收良好，并能迅速而广泛地分布于身体各组织[11]，通过皮脂分泌，以及经真皮、表皮层扩散到达角质层。由于特比萘芬可以在甲床中扩散，所以其能快速渗透进入指甲。在停止治疗很长一段时间后仍可持续存在于指甲中。特比萘芬通过人肝细胞色素 P-450(CYP)酶系统进行代谢，无活性代谢产物主要随尿排出[12]。

4. 临床应用 特比萘芬是首选治疗皮肤和指甲皮肤癣菌感染的药物，但局部治疗被认为是不恰当或无效的[13-14]。特比萘芬治疗由非皮肤癣菌引起的指甲真菌感染(甲真菌病)和治疗犬小孢子菌引起的头皮感染的疗效不如伊曲康唑。已证明特比萘芬对一些曲霉菌病、着色芽生菌病和孢子丝菌病患者的治疗有效[15]，但尚未被批准用于这些适应证。大量的临床研究表明，特比萘芬与伏立康唑联用治疗多育节荚孢霉(*Lomentospora prolificans*)引起的感染，疗效更佳[16,17]。

5. 药物相互作用 虽然特比萘芬通过人肝细胞色素 CYP 酶系统进行代谢，但往往临床相关的浓度不能抑制大部分 CYP 酶[12]。特比萘芬与利福平(rifampin)等诱导肝 CYP 系统的药物合用时，会导致特比萘芬血药浓度降低。

6. 不良反应 特比萘芬会产生一些不良反应，包括腹部不适、恶心、腹泻、味觉的损伤及暂时性皮疹[18]。较罕见但较为严重的不良反应包括 Stevens-Johnson 综合征和肝毒性反应，包括胆汁淤积和肝炎。

二、唑类

该大群包括许多化合物，属于合成药物，用于皮肤癣菌感染和浅表念珠菌病的局部治疗，有较好疗效；其中一些可用于全身给药。这一群的成员有一个共同点是都含有一个具有氮-碳取代(N-carbon substitution)的咪唑或三唑环。三唑类可作为全身性使用的抗真菌药物。

(一)作用机制

唑类化合物能抑制真菌细胞色素 CYP 依赖酶，羊毛固醇 14α-去甲基化酶，该酶负责将羊毛固醇转化为麦角固醇，而麦角固醇是敏感真菌细胞膜的主要固醇。唑类药物会导致各种有毒的甲基固醇的蓄积和麦角固醇的缺乏，从而破坏膜结构和功能。虽然伏立康唑和伊曲康唑能发挥杀菌效果，但当使用推荐剂量给药所达到的浓度，对曲霉菌属和其他一些霉菌基本上起抑制的作用[19]。

第 133 章描述了几种耐药机制，主要包括多种药物外排转运基因的上调，编码靶酶即羊毛固醇 14α-去甲基化酶的 *ERG*11 基因的上调，以及由于固有或获得性氨基酸取代导致这种酶与唑类抗菌药物亲和力降低[20-21]。其他参与麦角固醇生物合成途径酶的改变，$\Delta^{5,6}$ 固醇脱饱和酶活性的降低，也可导致对唑类药物的耐药[20]。当唑类耐药是由药物外排介导的，唑类药物间常存在交叉耐药。

(二)药物动力学

除氟康唑和艾沙康唑外，食物对唑类抗菌药物的吸收有显著影响。摄取富含脂类的食物会提高酮康唑、泊沙康唑和伊曲康唑胶囊剂型的吸收[22-23]。相比之下，高脂肪膳食会减少伏立康唑和伊曲康唑口服液剂型的吸收[24]。

通常情况下，口服唑类药物 2～3 h 后血药浓度达到峰值。对于氟康唑和泊沙康唑，血药浓度增加与给药剂量成比例[25]。相比之下，由于可饱和的肝首过代谢导致伊曲康唑剂量的增加与血液峰浓度不成比例变化[26]。在成人，提高口服和注射伏立康唑的剂量与血药浓度增加不成比例[27]，而在儿童，血药浓度与剂量的增加成比例变化，并且对药物清除更迅速[28]。

由于氟康唑的低蛋白结合率(大约 12%)，使其在大部分组织和体液中都能达到高浓度。脑脊液(CSF)中药物浓度通常超过同时的血药浓度的 50%[27]。同样，伏立康唑广泛分布于组织中[29]，脑脊液浓度大约是同时的血药浓度的 30%～60%[29]。玻璃体和房水中伏立康唑和氟康唑的浓度，大约是同时血药浓度的 40%～50%，这使其可有效地治疗眼内炎[30]。伊曲康唑在脑脊液中的药物浓度是最低的[22]。

伊曲康唑在肺、肝、大脑和骨骼这些组织中的浓度比血清浓度高 2～3 倍。同样，由于伊曲康唑能通过皮脂分泌，所以发现其在角质层中的浓度也较高[31]。在一个疗程治疗结束后，发现伊曲康唑在皮肤和指甲中可持续存在数周至数月，因此，对于皮肤癣菌感染和甲真菌病可实行间歇脉冲式治疗方案[22,31]。

除氟康唑和泊沙康唑外，其他唑类药物通过人类肝 CYP 酶系统进行广泛代谢，无活性代谢产物通过胆汁或尿进行排出。超过 90%剂量的氟康唑主要以不变的药物原型从尿排出，因此可用它治疗由敏感菌株引起的尿路感染[32]。泊沙康唑剂量的 75%以上主要以不变的药物原型从粪便排泄，其余以葡萄糖醛酸衍生物的形式随尿排出[33]。伊曲康唑有所不同，因为其主要代谢产物羟基伊曲康唑具有生物活性，并且与母体化合物具有相似的活性谱[34]，该代谢产物在血清中的浓度高于其母体药物的 2 倍[22]。

伏立康唑通过几种不同的肝 CYP 酶进行代谢，主要为 CYP-2C19，其 80% 以上的剂量以无活性代谢产物形式随尿排出[27]。然而，由于编码这些酶的基因可发生点突变，所以会导致部分人群为弱代谢型，而部分为强代谢型。3%～5%的白种人和 15%～20%的非印度亚洲人属于弱代谢型[35]。强代谢型个体中伏立康唑血药浓度比弱代谢型个体低 4 倍，而弱代谢型个体则会达到中毒浓度。

艾沙康唑经 CYP-3A4 和 CYP-3A5 代谢，在粪便中被清除[36]，它表现出线性药代动力学，并且似乎不需要治疗药物监测。

(三)药物相互作用

大部分唑类抗真菌药物通过人类肝 CYP 酶系统进行广泛代谢，是 CYP-3A4 的强效抑制剂，有些还能抑制 CYP-2C9 和 CYP-2C19。当唑类药物与其他同样通过这些酶进行代谢的药物同时服用时，会导致唑类药物或相互作用药物的血药浓度升高，或 2 种药物的血药浓度同时升高[37]。当停止使用唑类药物时，会出现代谢的变化，可能需要向上或向下调整其他药物的剂量。将唑类与人类肝 CYP 酶系统强力诱导剂，如利福平联合使用，会使唑类的血药浓度显著降低，尤其是伊曲康唑[37]。

(四)氟康唑

氟康唑(Diflucan)是一种水溶性的双三唑药物，具有口服和注射剂型。被广泛用于预防及治疗酵母菌感染，尤其用于念珠菌病及隐球菌病的治疗。

1. 活性谱　氟康唑是目前适合全身使用的唑类抗真菌药物中活性谱最窄的一个品种。其对大多数的念珠菌属和隐球菌属(*Cryptococcus* spp.)具有抗菌活性[38-39]。但是，克柔念珠菌(*Candida krusei*)对氟康唑是天然耐药的，光滑念珠菌(*Candida glabrata*)和耳念珠菌(*Candida auris*)对其敏感性是降低的[40]。氟康唑活性谱也包括几种双相真菌[皮炎芽生菌(*B. dermatitidis*)、球孢子菌(*Coccidioides* spp.)和荚膜组织胞浆菌(*H. capsulatum*)][41]。氟康唑对曲霉菌属(*Aspergillus* spp.)、镰刀菌属(*Fusarium* spp.)或毛霉菌属(*Mucorales*)无抗菌活性。

2. 获得性耐药　黏膜或深部组织念珠菌病患

者接受短期氟康唑治疗后，在白色念珠菌(*C. albicans*)中很少有氟康唑耐药发展的报道[42]。相比之下，许多光滑念珠菌在治疗期间会快速对氟康唑产生耐药[42]，耳念珠菌亦会如此[43]。在AIDS患者中，经反复低剂量氟康唑治疗口腔或食管感染后，往往会出现白色念珠菌耐药株。然而，随着针对HIV感染的高活性抗逆转录病毒治疗药物的广泛使用，现在耐药菌株已很少见。有少量关于复发感染的AIDS患者，利用氟康唑进行长期维持治疗后，出现新型隐球菌耐药株的报道，但是这些案例被认为是罕见的[44]。

3. 临床应用 氟康唑被广泛用于黏膜和全身性念珠菌病[45]、球孢子菌病[46]和隐球菌病[47]的治疗。同时还被推荐用于重症监护病房中预防高危成人患者的念珠菌病[45]，以及预防AIDS患者隐球菌性脑膜炎的复发[47]。氟康唑可作为治疗组织胞浆菌病和孢子丝菌病的替代药，但疗效不如伊曲康唑[48-49]。

4. 治疗药物监测 氟康唑血清浓度可通过使用剂量、器官功能进行预测，不需要对药物浓度进行常规监测[50]。

5. 不良反应 氟康唑是一种毒性最低、耐受性最好的唑类药物，治疗期间不良反应也较少。最常见的患者主诉包括头痛、脱发和食欲缺乏。有报道出现短暂的肝酶异常及罕见的严重皮肤反应，包括Stevens-Johnson综合征。

(五)艾沙康唑

艾沙康唑(Cresemba; Astellas Pharma)是第二代广谱三唑化合物，可以口服胶囊或静脉内给药。它是一种水溶性前药，硫酸艾沙康唑，被血液或胃肠道中的血浆酯酶水解成活性化合物艾沙康唑。静脉内制剂不需要环糊精，使其成为肾功能不全患者的一种选择。艾沙康唑的化学结构类似于氟康唑和伏立康唑，具有良好的口服有效性，食物摄入对血浆浓度没有影响。该药物表现出线性药代动力学，蛋白结合度高，通过胃肠道排出，在尿中排出的不到1%。该药的半衰期为80～100 h，这使得可以每天给药1次[51]。在大鼠模型中评估了该药的组织渗透性，显示其在肝和胆汁中的浓度最高，脑、肾和肠黏膜的浓度较高，而骨骼和眼睛晶状体中的浓度最低[52]。

1. 活性谱 艾沙康唑对念珠菌[53]、隐球菌[54]和非念珠菌酵母菌如毛孢子菌、红酵母和酿酒酵母菌[55]有活性。艾沙康唑对曲霉菌[53,56]和地方性真菌[57-58]具有良好的抑菌活性。对着色真菌的抗菌活性因不同种而不同[57,59-60]，对毛霉菌目的活性[61-62]亦如此。它对赛多孢菌属(*Scedosporium* spp.)[57,63]、多育节荚孢霉(*Lomentospora prolificans*)[63]或镰刀菌属[57,64]没有很好的活性。

2. 获得性耐药 艾沙康唑的临床使用才刚刚开始，因此，获得性耐药并不多见。在一项对唑类耐药的念珠菌属分离株的研究中，与伏立康唑相似，艾沙康唑的MICs有所增加[65]。也有证据表明，烟曲霉菌对唑类泛耐药的分离株也对艾沙康唑耐药[66]。

3. 临床应用 在美国，艾沙康唑已被批准用于治疗曲霉菌病和毛霉菌病。在Ⅲ期临床试验中，发现艾沙康唑在治疗侵袭性曲霉菌病方面不逊于伏立康唑[56]。在欧盟，它被批准用于治疗侵袭性曲霉菌病和对两性霉素B不合适的患者的毛霉菌病。在一项治疗念珠菌血症的Ⅲ期临床试验中，艾沙康唑未能表现出对卡泊芬净的非劣效性。然而，在食管念珠菌病的Ⅱ期临床试验中，艾沙康唑不逊于氟康唑[67]。在另一项Ⅲ期试验中，比较了艾沙康唑口服后静脉注射与口服伏立康唑后使用卡泊芬净治疗念珠菌血症或侵袭性念珠菌病，结果不符合非劣效性界限。在一项针对地方性真菌病和隐球菌的开放性Ⅲ期试验中，艾沙康唑显示出良好的临床疗效[58]。

4. 治疗药物监测 在Ⅲ期临床试验期间，患者组的平均谷值超过了大多数目标微生物的MIC_{90}，目前认为不需要对药物水平进行常规监测[68]。

5. 不良反应 艾沙康唑耐受性良好。最常见的副作用是腹痛、结膜炎、腹泻、鼻炎和鼻咽炎[51]。在与伏立康唑的Ⅲ期直接试验中，与伏立康唑相比，艾沙康唑的药物相关不良反应较少[56]。

(六)伊曲康唑

伊曲康唑(Sporanox)是一种亲脂性三唑类药物，可口服或注射。伊曲康唑应用广泛，特别是治疗浅表真菌感染，也可用于各种皮下和全身性感染的治疗。

1. 活性谱 伊曲康唑属于广谱抗真菌药物，对曲霉菌属[69-71]、念珠菌属[69,72-73]、许多着色霉

菌[5]、皮肤癣菌[2-4]，以及双相真菌（皮炎芽生菌、球孢子菌属、荚膜组织胞浆菌、巴西副球孢子菌、马尔尼菲篮状菌和申克孢子丝菌）[9-10,41,74]具有很强的抗菌活性。伊曲康唑对新型隐球菌具有一定的抗菌活性[69]，但对赛多孢菌属[63]和大部分毛霉菌[75]无效。

2. 获得性耐药 已有报道烟曲霉菌（*A. fumigatus*）在治疗后出现伊曲康唑耐药株[76-77]。由于 cyp51A，TR_{34}/ L94H 和 TR46/ Y121F/ T289A 在环境中获得的突变而引起的伊曲康唑耐药性的报道越来越多[78]。这种突变现已在来自亚洲、非洲、北美、南美和澳大利亚的分离株中得到确认，并已成为部分欧洲国家的一个严重问题[79]。

3. 临床应用 伊曲康唑被广泛用于各种浅表真菌感染的治疗，包括皮肤癣菌病、甲真菌病、花斑糠疹及黏膜和皮肤念珠菌病。伊曲康唑对副球孢子菌病、着色芽生菌病、孢子丝菌病和某些着色丝孢霉病也有疗效。尽管存在局限性，伊曲康唑仍可选择性用于轻中度芽生菌病和组织胞浆菌病的治疗[49,80]。伊曲康唑是第一个对曲霉菌病有抗菌活性的口服药，但是在重症患者危及生命的情况下不推荐使用[81]。伊曲康唑是预防 AIDS 患者荚膜组织胞浆菌病复发而长期维持治疗的首选药物[49]，但是对 AIDS 患者隐球菌病维持治疗的效果不如氟康唑[47]。

4. 治疗药物监测 伊曲康唑胶囊剂型的口服吸收效果在个体间存在显著差异。血药浓度低往往预示治疗失败，当用于治疗或预防严重的侵袭性真菌感染时，建议测定血药浓度[50]。用于预防时，建议谷浓度$>0.5\mu g/ml$；用于治疗时，推荐谷浓度$>1\sim2\ \mu g/ml$[50]。

5. 不良反应 大部分与伊曲康唑有关的不良反应都较轻微且可逆。最常报道的不良反应是头痛、食欲缺乏、恶心、腹部不适、腹泻、皮疹及肝酶的短暂升高。胃肠道不适最常见于口服伊曲康唑，有时甚至严重到需要停止治疗[26]。罕见但较为严重的不良反应包括 Stevens-Johnson 综合征、肝炎和充血性心力衰竭。

（七）酮康唑

酮康唑（Nizoral）是一种亲脂性药物，适用于口服或局部用药。它是唯一可用于全身给药的咪唑类抗菌药物，但目前主要作为局部药物在使用。

1. 活性谱 酮康唑对皮肤癣菌[82]和双相真菌（皮炎芽生菌、球孢子菌属、荚膜组织胞浆菌、巴西副球孢子菌和申克孢子丝菌）有抗菌活性[83]。虽然酮康唑与新的三唑类药物相比效果差些，但其对念珠菌属和新型隐球菌同样有抗菌活性。

2. 获得性耐药 虽然酮康唑获得性耐药很罕见，但在20世纪80年代，记录了数例由白色念珠菌引起的慢性皮肤黏膜念珠菌病，经长期治疗后出现获得性耐药的情况。

3. 临床应用 由于毒性更小、更有效的替代品的出现，除了在资源有限的环境外，酮康唑现在很少被使用。但酮康唑依然是皮肤癣菌病、皮肤念珠菌病、花斑糠疹和脂溢性皮炎的局部治疗用药[82]。

4. 不良反应 酮康唑的不良反应包括食欲缺乏、腹痛、恶心和呕吐。口服酮康唑后常出现短暂的肝酶升高，虽然重症肝炎是罕见的，但它是公认的不良反应。大剂量酮康唑会抑制人体肾上腺和睾丸类固醇的合成，并可导致脱发、男性乳房发育症和阳痿等的临床后果。

（八）泊沙康唑

泊沙康唑（Noxafil）是第二代广谱三唑化合物，有口服混悬液、静脉制剂和片剂。新的静脉给药制剂可以用于重症患者的治疗，而伏立康唑曾在这方面具有处方优势。泊沙康唑具有高度亲脂性，其化学结构与伊曲康唑相似。

1. 活性谱 泊沙康唑对大部分曲霉菌属[70,84]，以及念珠菌属、新型隐球菌和毛孢子菌属（*Trichosporon* spp.）[39,72,85-87]具有很高的抗菌活性。对双相真菌也具有强的抗真菌活性，包括皮炎芽生菌、球孢子菌属、荚膜组织胞浆菌、马尔尼菲篮状菌和申克孢子丝菌[41,57]。泊沙康唑对镰刀菌属和赛多孢菌属的抗菌活性相对较低，但对着色真菌似乎有效[57,63,88]。与其他唑类药物不同的是，泊沙康唑对某些毛霉菌有显著的抗菌活性[75,89-91]。

2. 获得性耐药 泊沙康唑有时候可对伊曲康唑、氟康唑和（或）伏立康唑表现耐药的曲霉菌属和念珠菌属有活性[92]。对泊沙康唑耐药的烟曲霉菌被证明存在 TR_{34}/L98H 突变[93]。

3. 临床应用 在美国，泊沙康唑已被批准用于治疗口咽念珠菌病[包括伊曲康唑和（或）氟康唑难治性感染]，以及对侵袭性曲霉菌病和念珠菌

病高危患者的预防用药，如接受造血干细胞移植(HSCT)并具有移植宿主反应者和中性粒细胞减少的癌症患者。在欧盟，泊沙康唑已被批准用于类似适应证，也可作为侵袭性曲霉菌病、球孢子菌病、着色芽生菌病、镰刀菌感染和足菌肿的抢救性治疗。目前，已证明泊沙康唑治疗有效但尚未批准的其他适应证，包括组织胞浆菌病[94]、球孢子菌病[95]和毛霉菌引起的感染[91,96]。

4. 治疗药物监测 同伊曲康唑和伏立康唑相似，泊沙康唑谷值血药浓度和临床疗效之间存在一定的关系，因此测定其药物水平可能是有用的[27,50]。用于预防时，建议谷浓度>0.5 μg/ml；用于治疗时，推荐谷浓度最低 0.5～1.5 μg/ml[50]。口服泊沙康唑的吸收因所用的剂型不同而不同。在胶囊给药或静脉给药后，可能没有必要监测血药水平。

5. 不良反应 患者通常对泊沙康唑有良好的耐受性，即使是接受药物治疗超过 6 个月的患者[97]。最常报道的不良反应是胃肠道症状和头痛，暂时性的转氨酶异常也见报道。在泊沙康唑治疗期间可发生罕见的胆汁淤积或肝衰竭。

(九)伏立康唑

伏立康唑(Vfend)是第二代广谱三唑化合物，可用于口服或静脉给药。其化学结构与氟康唑相似。

1. 活性谱 伏立康唑对大多数曲霉菌属、镰刀菌属和赛多孢菌属[57,63,70,88]、念珠菌属、新型隐球菌和毛孢子菌属[39,44,72,85-86]具有很高的抗菌活性。伏立康唑对双相真菌，包括皮炎芽生菌、球孢子菌属、荚膜组织胞浆菌、马尔尼菲篮状菌[57,74]及着色霉菌[57]，也具有强的抗菌活性。伏立康唑对毛霉菌是无效的[75,90]。

2. 获得性耐药 某些氟康唑耐药念珠菌也表现对伏立康唑的敏感性降低，基本上所有对氟康唑耐药的光滑念珠菌都对伏立康唑不敏感。曲霉菌属真菌在长期唑类治疗期间可产生获得性伏立康唑耐药。烟曲霉菌在环境中获得对伏立康唑耐药，主要由 CYP-51A 基因的 TR_{34}/L98H 突变引起[76,92,98]。新出现的烟曲霉菌突变 TR_{46}/Y121/T289A 似乎是伏立康唑耐药的特异性突变[76,92,98]。

3. 临床应用 伏立康唑最明显的优势是当治疗病重患者时，具有静脉输注和吸收良好的口服剂型可用。在美国，伏立康唑已被批准用于侵袭性曲霉菌病的治疗，并且已成为这些感染的首选药物[81]。伏立康唑也被批准用于非中性粒细胞减少患者的念珠菌血症、念珠菌引起的播散感染和食管念珠菌病的治疗，此外还可用于镰刀菌和赛多孢霉属感染的抢救治疗。在欧盟，伏立康唑已被允许用于类似适应证，伏立康唑对毛霉菌无活性，有时伏立康唑可用于免疫功能不全患者由这些微生物引起的暴发感染的治疗。

4. 治疗药物监测 伏立康唑血药浓度变化较大，很大程度上是由于不同个体间代谢率的差异，对监测药物浓度可能是有益的[27,50,99]。用于预防时，建议谷浓度>0.5 μg/ml；用于治疗时，推荐谷浓度>1～2 μg/ml[50]。为避免中毒，伏立康唑的谷浓度不应超过 6 μg/ml。

5. 不良反应 患者通常对伏立康唑有良好的耐受性。大约 30% 患者在第 1 周治疗期间，会出现短暂的视觉障碍和幻觉[99]。其他不良反应包括皮疹和短暂的肝酶异常。罕见但严重的副作用包括 Stevens-Johnson 综合征、肝衰竭和心血管疾病。

三、棘白菌素类

棘白菌素是一类新型半合成脂肽类抗菌药物，作用于真菌细胞壁。3 种棘白菌素已被批准用于严重真菌感染的治疗：阿尼芬净、卡泊芬净和米卡芬净。由于棘白菌素的高分子量及口服生物利用度低，因此这类药物只能作为静脉给药在临床使用。目前，棘白菌素使用广泛，尤其是针对念珠菌病的治疗。

(一)作用机制

棘白菌素通过抑制 1,3-β-D-葡聚糖合成酶从而破坏真菌细胞壁的合成。1,3-β-D-葡聚糖是敏感真菌细胞壁的重要多糖成分，抑制 1,3-β-D-葡聚糖形成使细胞渗透性溶解，最终导致细胞死亡。棘白菌素与 1,3-β-D-葡聚糖合成酶的主要亚基 Fksp 结合，Fksp 在念珠菌中由 3 种 *FKS* 基因编码[100]。棘白菌素对念珠菌起杀菌作用，而对曲霉菌属真菌起抑菌作用，棘白菌素阻碍菌丝顶端的生长[101]。

(二)活性谱

棘白菌素的活性谱较窄。其对念珠菌的抗菌活性很强,包括氟康唑耐药菌株[72,102-103]。棘白菌素对近平滑念珠菌(*C. parapsilosis*)、葡萄牙念珠菌(*C. lusitaniae*)和季也蒙念珠菌(*C. guilliermondii*)的 MIC 值较高,但是这些数值的临床表现还不清楚[102,104]。棘白菌素对曲霉菌属真菌也具有抗菌活性,包括那些对两性霉素 B 天然耐药的菌株[105-106]。

棘白菌素对于细胞壁中缺乏 1,3-β-D-葡聚糖的真菌是无效的,包括新型隐球菌、毛孢子菌属、镰刀菌属和毛霉菌[107]。据报道,米卡芬净对某些双相真菌的菌丝有抑制作用,包括皮炎芽生菌和荚膜组织胞浆菌,但对这些病原菌的组织结构不起作用[108]。

(三)获得性耐药

目前,棘白菌素耐药很罕见,但在棘白菌素治疗失败的患者中已检出几株念珠菌棘白菌素耐药株[43,109-110]。发生耐药主要与*FKS1* 和(或)*FKS2* 基因获得性突变有关,致使 1,3-β-D-葡聚糖合成酶的 Fks1p 和 Fks2p 亚基发生氨基酸取代[103,109,111]。这些变化导致药物结合位点改变,并产生对所有棘白菌素药物的交叉耐药性。*FKS1* 和*FKS2* 基因突变导致大多数念珠菌对卡泊芬净、米卡芬净和阿尼芬净的易感性降低[111]。对棘白菌素耐药率最高的是光滑念珠菌,尤其是已经对氟康唑耐药的菌株[103,109,112]。

(四)药物动力学

3 种棘白菌素药物的血药浓度增加与剂量成比例变化[27,113]。这些药物可广泛分布于机体各种组织,但在脑脊液中的浓度可以忽略不计。各类药物之间的主要差别是代谢和半衰期不同。卡泊芬净和米卡芬净主要由肝代谢,其无活性代谢产物随粪便和尿排出[27,114]。阿尼芬净不是通过肝代谢消除,而是在血液中通过缓慢的非酶途径降解成无效的开环肽[115]。只有不到 1%～3%的棘白菌素以原型药物形式随尿排出[27,114,116-117]。在成人中,卡泊芬净的半衰期为 9～10 h[117],米卡芬净的半衰期为 13 h[118],阿尼芬净的半衰期为 18～27 h[115]。3 种棘白菌素药物在儿童体内的半衰期较短[119]。24 h 浓度－时间曲线下面积(AUC)/MIC 比值是反应暴露－应答关系的一个良好指标,其比值应超过 10～20[120]。

(五)药物相互作用

棘白菌素与人类肝 CYP 系统之间无相互作用,且使用时很少发生显著的药物相互作用。

(六)治疗药物监测

目前,棘白菌素血药浓度与疗效或毒性之间的关系尚未明确[27,50,121]。在用棘白菌素治疗期间不需要常规监测血药浓度。

(七)不良反应

由于棘白菌素的耐受性良好,应用时极少发生严重的不良反应[113,116-118]。最常见的不良反应是胃肠道反应,但仅见于 5%的患者。使用阿尼芬净和米卡芬净时,偶尔会出现输液相关疼痛和静脉炎,但对于卡泊芬净来说不常见。有报道在少数患者中会出现短暂的肝酶升高。

(八)阿尼芬净

阿尼芬净(Ecalta,Eraxis)是第一个被研发,并于最近批准在临床使用的棘白菌素类药物。它与卡泊芬净和米卡芬净的不同之处是其不溶于水。阿尼芬净衍生于构巢曲霉(*Aspergillus nidulans*)发酵产物,目前仅有静脉输注剂型。

临床应用　目前,在美国,阿尼芬净已被批准用于食管念珠菌病、念珠菌血症及 2 种侵袭性念珠菌病(腹部脓肿和腹膜炎)的治疗。在欧盟,阿尼芬净被批准用于非中性粒细胞减少患者侵袭性念珠菌病的治疗,但尚未有阿尼芬净对足够数量中性粒细胞减少患者疗效情况的评价数据。

(九)卡泊芬净

卡泊芬净(Cancidas)是一种水溶性脂肽类化合物,衍生于丝状真菌(*Glarea lozoyensis*)发酵产物,目前仅有静脉输注剂型。

临床应用　目前,在美国,卡泊芬净已被批准用于食管念珠菌病、念珠菌血症,以及某些侵袭性念珠菌病,包括腹部脓肿、腹膜炎和胸膜腔感染的治疗。卡泊芬净也被允许用于其他抗真菌药物治疗失败或不耐受的侵袭性曲霉菌属真菌感染患者的抢救治疗。卡泊芬净被批准用于发热疑似真菌

感染的中性粒细胞减少患者的经验性治疗。在欧盟，卡泊芬净使用的适应证和美国相似，被批准用于成人和儿童患者的侵袭性念珠菌病治疗、曲霉菌病的抢救治疗及发热的中性粒细胞减少成人和儿童患者的经验性治疗。

(十)米卡芬净

米卡芬净(Mycamine)是一种水溶性抗菌药物，衍生于 Coleophoma empetri 发酵产物，目前仅有静脉输注剂型。

临床应用 目前，在美国，米卡芬净已被批准用于治疗成人食管念珠菌病、念珠菌血症及某些侵袭性念珠菌病，如腹部脓肿和腹膜炎；同时还用于造血干细胞移植(HSCT)患者念珠菌感染的预防。在欧盟，此药被批准用于成人食道念珠菌病及成人、儿童，包括新生儿的侵袭性念珠菌病的治疗。此外，无论在美国还是欧盟，米卡芬净被允许作为造血干细胞移植接受者的预防性治疗，以防止念珠菌感染。在日本，米卡芬净被允许用于曲霉菌属真菌引起的呼吸道和胃肠道真菌病的治疗。在欧盟，米卡芬净的确有一个黑匣子警告，因为长期服用米卡芬净会导致大鼠肝脏肿瘤的发展，但是在上市后的患者身上并没有发现这种情况。

四、多烯类

目前，已描述的多烯类抗生素大约有 100 种，但只有少部分被开发在临床上使用。两性霉素 B 及其脂类剂型可用于治疗全身性真菌感染。制霉菌素、纳他霉素和美帕曲星是治疗口腔、阴道和眼部真菌感染外部使用的多烯类药物。制霉菌素脂质体制剂曾进入临床试验，但是其开发已停止。多烯类是由封闭的大环内酯环构成的大分子物质，环的一侧是由不定数量的共轭双键组成的具有严格亲脂性的链，另一侧是同样数量的羟基。因此，其属于两性分子，该结构特征被认为与其作用机制有重要关系。

(一)作用机制

多烯类药物能与敏感真菌细胞膜上主要成分麦角固醇结合，从而导致膜屏障功能受损、细胞内容物外溢、代谢紊乱和细胞死亡[122]。除了对细胞膜通透性有影响外，两性霉素 B 还会通过一连串的氧化反应使细胞膜脂质过氧化，从而引起真菌细胞氧化性损伤。

(二)两性霉素 B

两性霉素 B(Fungizone)是结节链霉菌(*Streptomyces nodosus*)的一种发酵产物，可用于静脉给药。该药物传统的胶束悬浮液(两性霉素 B 脱氧胆酸盐)常有严重的不良反应，尤其是肾损伤。为了减轻这种药物的毒性，在 20 世纪 90 年代，研发了 3 种新型两性霉素 B 脂类剂型，分别是两性霉素 B 脂质体(AmBisome; Astellas Pharma, Gilead Sciences)，药物被包裹在含磷脂的脂质体中；两性霉素 B 脂质复合体(ABLC)(Abelcet; Enzon Pharmaceuticals)，药物与磷脂复合形成带状结构；以及两性霉素 B 胶状分散体(ABCD)(Amphotec; Three Rivers Pharmaceuticals)，药物被包裹进含硫酸胆固醇的小脂质圆片中。这些剂型与胶束悬浮液具有相同的广谱抗菌活性，但肾毒性降低[123]。还有一种正在开发中的两性霉素 B(MAT2203; Matinas Biopharma)。这种脂质传递机制允许口服给药，并导致良好的组织渗透[124-125]。一项针对难治性皮肤黏膜念珠菌病的Ⅱ期临床试验正在进行中。

1. 活性谱 两性霉素 B 对大部分曲霉菌属[81,126]、念珠菌属[72-73]、隐球菌属[39,44,54]和毛霉菌[75,90]等病原性真菌具有广谱抗菌活性。然而，大部分土曲霉(*A. terreus*)对两性霉素 B 耐药[127-128]。与之相似，一种新的与烟曲霉相似种迟缓曲霉(*Aspergillus lentulus*)也对两性霉素 B 耐药[129]。另外，克柔念珠菌和葡萄牙念珠菌对两性霉素 B 的敏感性减低。两性霉素 B 对双相真菌(皮炎芽生菌、球孢子菌属、荚膜组织胞浆菌和巴西副球孢子菌)和许多着色真菌具有抗菌活性[74,130]。赛多孢菌属、多育节荚孢霉、镰刀菌属和毛孢子菌属常常对两性霉素 B 天然耐药[63,86,131]。

2. 获得性耐药 两性霉素 B 获得性耐药罕见，但白念珠菌、光滑念珠菌、季也蒙念珠菌、热带念珠菌、新型隐球菌，尤其是葡萄牙念珠菌，经长期治疗后，细胞膜会发生改变，包括大量麦角固醇的减少，从而出现两性霉素 B 耐药[132]。在新出现的希木龙念珠菌(*Candida haemulonii*)、假希木龙念珠菌(*Candida duobushaemulonii*)和耳念珠

菌(*C. auris*)中也发现了两性霉素 B 耐药[133]。

3. 药物动力学　两性霉素 B 口服吸收效果较差，所以必须进行缓慢的静脉输注给药。该药可广泛分布于人体许多组织，在肝、脾和肾的浓度最高。脑脊液中的含量不到血药浓度的 5%。两性霉素 B 主要通过尿(21%)和粪便(42%)以原型药物形式排泄[134]。没有鉴定出任何代谢产物。药物清除很缓慢，传统的两性霉素 B 脱氧胆酸盐剂型终末半衰期大约为 127 h。

两性霉素 B 脂类制剂的药物动力学有很大的不同。两性霉素 B 脂质体的最高血药浓度远高于两性霉素 B 脱氧胆酸盐，而对于 ABCD 和 ABLC，由于其快速分布至组织中，所以其血药浓度较低[123,134]。两性霉素 B 脂类制剂给药后，在肝脏和脾脏中药物浓度远高于传统制剂所达到的浓度[135]。两性霉素 B 脂类制剂在肾脏中的药物浓度较低，因此，对肾毒副作用大大降低[136]。

4. 临床应用　尽管不断有新的其他抗菌药物出现，但两性霉素 B 仍然是治疗许多严重真菌感染的最好选择，如芽生菌病、球孢子菌病、组织胞浆菌病、孢子丝菌病、隐球菌病和毛霉菌病[46-49,80]。然而，随着伏立康唑和棘白菌素的出现，在许多情况下两性霉素 B 不再被视为是治疗曲霉菌病或念珠菌病的首选药物。目前，3 种两性霉素 B 脂类制剂被允许用于对传统的两性霉素 B 难治或不耐受的侵袭性真菌感染者的治疗。此外，两性霉素 B 脂质体还被允许用于治疗 AIDS 患者的隐球菌性脑膜炎，以及发热的中性粒细胞减少患者中疑似真菌感染的经验治疗。临床经验表明两性霉素 B 脂类制剂比传统两性霉素 B 更安全且活性不降低，对某些感染甚至更有效，特别是由于毒性降低了，可以较高剂量使用这些药物。

5. 药物相互作用　两性霉素 B 可增加许多其他药物的肾毒性，包括氨基糖苷类抗生素和环孢霉素。

6. 治疗药物监测　两性霉素 B 在血清和组织中的浓度根据剂型的不同有很大差异，尤其是在脂类药物中，有关血液浓度与疗效或毒性相关性的数据很少。因此，在治疗期间不需要监测两性霉素 B 的血药浓度[27,50]。然而，由于两性霉素 B 具有肾毒性风险，因此，治疗期间应监测肾功能。

7. 不良反应　大约 70%的患者在输注两性霉素 B 脱氧胆酸盐时会出现相关输液反应，包括低血压、发热、寒战和发冷等[123]。两性霉素 B 主要的不良反应是肾毒性，肾毒性与剂量有关，有超过 80% 接受治疗的患者可能会出现肾毒性反应。所有脂类制剂均能降低两性霉素 B 诱发的肾衰竭风险[134,136]。然而，输液相关的不良反应，如缺氧和发冷，在用 ABCD 治疗患者中更常见。相比之下，接受两性霉素 B 脂质体或 ABLC 治疗患者中很少出现输液相关反应[123,134,136]。

五、其他类药物

(一)氟胞嘧啶

氟胞嘧啶(5-氟胞嘧啶)(Ancobon)是一种合成的胞嘧啶氟化物，是抗代谢物中唯一的抗真菌剂。在美国，氟胞嘧啶作为口服片剂；在其他地方，它也可作为输液剂型用于注射给药。

1. 作用机制　氟胞嘧啶干扰嘧啶代谢，从而影响敏感真菌细胞内 DNA、RNA 和蛋白质的合成。氟胞嘧啶通过胞嘧啶通透酶的帮助被转运进细胞内，再通过胞嘧啶脱氨酶转化为氟尿嘧啶(5-FU)。氟胞嘧啶抗真菌活性有两种机制。第一种是将氟尿嘧啶转换成 5-氟尿苷三磷酸，5-氟尿苷三磷酸被掺入到真菌 RNA 中代替尿苷酸，从而抑制蛋白质合成。第二种机制是将氟尿嘧啶转换成 5-氟脱氧尿苷一磷酸，其能抑制胸苷酸合成酶作用，从而抑制真菌 DNA 合成。真菌缺乏胞嘧啶脱氨酶会导致对氟胞嘧啶天然耐药。

2. 活性谱　氟胞嘧啶的活性谱较窄，包括念珠菌属、新型隐球菌和某些引起着色芽生菌病的着色真菌[39,44,72-73,130]。念珠菌属对氟胞嘧啶原发性耐药很罕见，发生率为 2%～3%[72-73,137]。

3. 获得性耐药　单用氟胞嘧啶治疗常常会导致念珠菌属和新型隐球菌对氟胞嘧啶出现诱导耐药[138]。

4. 药物动学力　氟胞嘧啶口服给药后迅速并几乎完全被吸收。药物分布广泛，在大部分人体组织和体液中的浓度超过同时血药浓度的 50%[138]。氟胞嘧啶主要以药物原型经肾脏排出，其血清半衰期为 3～6 h，但在肾衰竭时可能大大延长，这就需要修改给药方案。

5. 临床应用　由于考虑耐药性风险，氟胞嘧啶很少单独使用，常与两性霉素 B 联合用于治疗念珠菌病和隐球菌病[45,47]。与氟康唑联合治疗 AIDS 相

关的隐球菌脑膜炎也被证明是有效的[47]。

6. 药物相互作用 阿糖胞苷(cytosine arabinoside)可竞争性抑制氟胞嘧啶抗真菌活性,因此,这两种药物不能同时给药[138]。肾毒性药物,如两性霉素 B,会使氟胞嘧啶排泄减少,当 2 种药物同时给药时,要监测两性霉素 B 的血药浓度。氟胞嘧啶具有抑制骨髓作用(见下文),所以当患者在接受如齐多夫定(zidovudine)等其他药物治疗时,要慎用,否则会加重免疫抑制的不良反应。

7. 治疗药物监测 为了降低肝和血液毒性的风险,建议定期监测氟胞嘧啶血药浓度。当有肾功能损害时,必须监测氟胞嘧啶血药浓度。为避免产生毒性,氟胞嘧啶的峰浓度不应超过 100 μg/ml[121]。与毒性研究相比,有关氟胞嘧啶血液浓度与疗效关系的数据则很少,较合理的目标是给药后浓度>25 μg/ml,但应<100 μg/ml[50,121]。

8. 不良反应 氟胞嘧啶最常见和伤害最小的不良反应是胃肠道反应,包括恶心、腹泻、呕吐和腹痛。最严重的不良反应是骨髓抑制和肝中毒[138]。维持过高的血药浓度会使这些并发症发生的概率更高。

(二)灰黄霉素

灰黄霉素是一种来源于许多青霉属菌种的抗真菌抗生素,包括灰黄青霉(*P. griseofulvum*)。于 1958 年进入临床,口服用于治疗皮肤真菌病。

1. 作用机制 灰黄霉素是一种抑制真菌的药物,作用机制是通过与微管蛋白结合,来抑制真菌细胞的有丝分裂[139]。

2. 活性谱 灰黄霉素活性谱仅限用于皮肤癣菌引起的皮肤、指甲和头发感染(表皮癣菌属、小孢子菌属和毛癣菌属)[2-3],罕见有关耐药性的报道。

3. 药物动力学 不同个体间灰黄霉素胃肠道吸收效果不同,但灰黄霉素与高脂肪膳食一起服用可促进其吸收。灰黄霉素在摄入几小时内就会出现在角质层中,是汗液分泌的结果。然而,当停止用药后药物浓度很快开始下降,在 48~72 h 内将不再能检测到。灰黄霉素通过肝代谢变成 6-去甲基灰黄霉素,然后随尿排出。

4. 临床应用 新的口服制剂,如特比萘芬和伊曲康唑通常是治疗指甲感染的首选药物,但灰黄霉素仍然是一种治疗中重度皮肤和毛发皮肤癣菌病有用的二线药物,局部治疗不合适或会治疗失败。

5. 药物相互作用 灰黄霉素与巴比妥类药物联合应用时,会减少对灰黄霉素的吸收。灰黄霉素可能会降低口服抗凝剂、口服避孕药和环孢霉素的药效。

6. 不良反应 在多数情况下,患者对灰黄霉素长疗程和高剂量耐受良好。大约 15% 的患者会发生不良反应,包括头痛、恶心、呕吐、腹部不适和皮疹。

六、开发中的新型抗真菌药物

人们现在正处于一个新的抗真菌药物不断发展的时代。新的抗真菌化合物,包括具有新靶点的化合物,以及对现有抗真菌药物的有希望的改进,目前正在开发中。下面讨论的是至少已经达到Ⅱ期临床试验的化合物。

1. APX001 APX001(E1210;Amplyx)是一种糖磷脂酰肌醇生物合成的小分子抑制剂,对念珠菌属和曲霉菌属及其他难以治疗的霉菌,如毛霉菌、镰刀菌和多育节荚孢霉具有广谱抗真菌活性。APX001 也对唑类和(或)棘白菌素耐药的真菌分离物有效,包括新出现的病原菌耳念珠菌[131,140-142]。

2. SCY-078 SCY-078(MK-3118; Scynexis)是一种结构独特的 1,3-β-D-葡聚糖合酶抑制剂(一种三萜葡聚糖合酶抑制剂),已开发用于治疗侵袭性真菌感染。与目前的棘白菌素不同,它具有口服生物利用度,并且其活性不受蛋白质靶点 Fks 内最常见突变的影响[143-144]。SCY-078 对最常见的念珠菌及耳念珠菌、曲霉菌属、变异拟青霉和多育节荚孢霉有体外和体内活性[145-147]。针对阴道和侵袭性念珠菌病的Ⅱ期研究已经完成。SCY-078 最近被美国 FDA 授予用于侵袭性念珠菌病和曲霉菌病的合格传染病产品称号。

3. F901318 F901318(F2G Ltd.)是一类新型的 Orotomide 抗真菌药物,其抑制参与嘧啶生物合成的二氢乳清酸脱氢酶。已经开发出口服和静脉内制剂以治疗全身性真菌感染的药物。它显示出对多种丝状真菌和双相真菌的有效活性,包括曲霉菌、荚膜组织胞浆菌、皮炎芽生菌、球孢子菌属、镰刀菌属、马尔尼菲篮状菌和多育节荚孢

霉[148-149]。值得注意的是，该试剂在体外和体内均有效地抵抗具有 TR_{34}/ L98H 突变的唑类耐药烟曲霉菌菌株[150-151]。对念珠菌或毛霉菌很少或根本没有活性[148]。

4. CD101 CD101(rezafungin；Cidara Therapeutics)是为了克服每日静脉注射棘白菌素的缺点，同时保留与该类药物相关的低毒性和真菌特异性活性的益处而开发的。对棘白菌素主链化学结构的调整降低了 CD101 的清除率，并延长了化合物的半衰期，大约是阿尼芬净的 3 倍[152]。因此，每周 1 次的静脉给药可以提供适当的全身 CD101 水平用于侵袭性真菌感染的治疗[153]。该化合物对棘白菌素耐药的念珠菌属包括耳念珠菌和曲霉菌属具有活性[154-155]。针对侵袭性念珠菌病的Ⅱ期试验已经完成。

5. VT-1598 和 VT-1161 VT-1598 和 VT-1161(Viamet Pharmaceuticals)作为真菌特异性的 14α-羊毛甾醇去甲基化酶抑制剂，选择性地靶向真菌酶，减少药物相互作用而开发[156]。VT-1161 在体外和体内对念珠菌、隐孢子虫属(*C. immitis*)、球孢子菌属和毛癣菌均有较强的抗菌活性，但单独用药对曲霉菌不起作用[157-160]。VT-1598 具有更广泛的抗真菌活性，其对念珠菌的体外抗菌活性包括：耳念珠菌、隐球菌属、曲霉菌属、米根霉、皮炎芽生菌和荚膜组织胞浆菌[161-163]。

6. 阿巴康唑 阿巴康唑(Stiefel)是一种生物利用度高、抗真菌活性强的口服制剂，针对足癣已完成Ⅰ期试验评价，用于脚趾甲真菌病治疗已完成Ⅱ期临床试验[164-166]。

七、结论

最近，新开发的抗真菌药物不断涌现，大大增加了抗真菌药物的数量，以有效抗击日趋增多的严重真菌感染。目前，很少出现因无有效的治疗方法而危及生命的情况，大部分情况下都有几种治疗方法可选。然而，笔者看到出现了多重耐药念珠菌，包括光滑念珠菌和耳念珠菌，因此有效的抗真菌药物管理将是一个挑战。审慎合理使用抗真菌药物，可避免抗菌药物耐药性。这些新开发中的抗真菌药物是否会投放市场，还有待观察。

参考文献请扫二维码查阅

第133章　抗真菌药物的耐药机制

DAVID S. PERLIN

（曹敬荣　译；陈宏斌、芮勇宇　审校）

严重的真菌感染，导致每年超过 1 350 000 人死亡[1]。某些真菌性疾病发病急且病情严重，如隐球菌性脑膜炎，另一些真菌病则容易反复发生，如念珠菌性阴道炎或艾滋病患者的口腔念珠菌病。最严重的真菌感染常发生于患有其他严重基础疾病的患者，如哮喘、艾滋病、肿瘤、器官移植和接受皮质类固醇治疗[1]。所有这些都需要专门的试验来诊断，且大多数需要抗真菌治疗。所有已报道与真菌有关的死亡病例中，超过 90%病例由以下 3 个菌属之一的菌种引起：隐球菌属、念珠菌属和曲霉菌属[1]。未能有效治疗常常会导致死亡、严重的慢性疾病或失明。真菌感染的重要性受到了全球公认，使得抗真菌药物在治疗和预防中的应用急剧上升。不幸的是，由于现有抗真菌药物化学种类很少，在治疗侵袭性真菌感染时，可供选择的药物有限。

抗真菌药物包括多烯类、唑类、5-氟胞嘧啶（5-FC）和棘白菌素类。其中唑类（如氟康唑、伏立康唑、泊沙康唑和艾沙康唑）是麦角固醇生物合成的靶分子。与哺乳动物细胞中的胆固醇类似，麦角固醇是真菌细胞质膜中的主要固醇。多烯类，如两性霉素 B 与细胞质膜中的麦角固醇结合，形成大的孔道而破坏细胞功能。5-氟胞嘧啶抑制嘧啶代谢和 DNA 的合成。最后，棘白菌素类（卡泊芬净、阿尼芬净和米卡芬净）是作用于细胞壁的药物，可抑制真菌细胞壁主要成分 β-1，3-D-葡聚糖的生物合成。

抗真菌药物的广泛使用导致了耐药性上升。流行的病原性真菌中，获得性耐药的出现，给患者管理带来严重的影响。更深入地了解具体耐药机制形成的生物学因素，对医学真菌学领域来说至关重要。本章重点描述抗真菌药物耐药机制详细和复杂的生物学和分子生物学特性。

一、临床和微生物学耐药的定义

抗真菌药物耐药性的发展是复杂的，依赖于多重宿主及微生物因素。讨论药物耐药性必须区别多层面的临床耐药和微生物对抗真菌药物的耐药。

“临床耐药”是指按标准剂量给药后，患者对某种抗真菌药物无反应，即治疗失败。各种各样宿主、药物药理学和微生物学因素都会导致治疗失败。一个主要因素是宿主的免疫状态。抗真菌药物和宿主免疫系统，往往须协同工作才能控制和清除感染。严重的免疫功能紊乱患者往往更难以治疗，因为抗真菌药物必须对抗无正向免疫反应的感染。留置导管、人工心脏瓣膜和其他外科设备的存在，也可引起难治性感染，因为感染真菌黏附在这些物体表面，产生具有抵抗性的生物膜从而保护真菌免于被药物清除。感染部位也可导致临床耐药，因为正确治疗要求药物以合适的浓度到达微生物靶位，来抑制微生物生长或杀死它。然而，人们仍然并非对所有感染部位的药物渗透性有充分的了解，结果造成某些微生物对药物的暴露水平不足。最后，患者对于药物治疗方案的依从性，对有效治疗来说也非常关键，因为依从性差会降低药物的疗效，并会促进持续耐药细胞群体的发展。

“微生物学耐药”是指在标准化的体外药物敏感性试验中，相对于一个敏感的标准参考菌株，一株真菌菌株对某种抗真菌药物的敏感性降低。按照美国临床和实验室标准化协会（CLSI）和欧洲抗菌药物敏感性试验委员会（EUCAST）制订的指南进行抗真菌药物敏感性试验的详细

细节在第 134 章中描述。药敏试验可提供一个 MIC 测量值，MIC 耐药折点是指能将治疗成功可能性高，与治疗更有可能失败的菌株区分开的药物浓度[2]。然而，解释体外抗真菌药物敏感性试验结果可能有争议，因为高于折点的 MIC 值并不总是与抗真菌疗效直接相关联。这种体内和体外数据之间出现明显不一致的情况称为“90-60 规则”，该规则认为由敏感菌株引起的感染，正确治疗有效率是 90%，然而，对于由耐药菌株引起的感染，治疗有效率是 60%[3]。微生物耐药可以是原发的（固有的）或继发的（获得的）。原发性耐药是在没有前期药物暴露的情况下，天然存在于某些真菌中。它可能涉及与获得性耐药相同的机制，或是未知的机制。

（一）原发性耐药

抗菌药物一般是为有效抗击引起疾病最主要的病原菌（如白色念珠菌）而研发。通用广谱活性（如全部真菌）是最理想的，但很少实现，并且在绝大部分敏感菌株中，总是有一部分菌株或自然产生的变种存在先天耐药。目前，有 200 多种念珠菌，而已知可引起人类感染的不到 40 种[4]，这些菌株中存在很大的遗传多样性，可影响药物的作用。抗真菌药物在不同真菌病中的广泛应用，可选择出自然存在的天然耐药株[5]。然而，从环境或患者中全面选择出耐药种、亚种或低敏感变异株并不常见[6]。原发性耐药的共同特征是，引起耐药的机制是固有的，而不是在治疗中获得的。

（二）唑类

唑类抗真菌药物是药物选择低敏感菌株最突出的例子[7]。大量的全球性流行病学研究已证明三唑类药物的广泛使用，对念珠菌菌种向低敏感菌株如光滑念珠菌（*C. glabrata*）和克柔念珠菌（*C. krusei*）的转换及分布产生了影响。在许多广泛使用唑类（如氟康唑）的地区，已出现引起侵袭性真菌感染的主要菌种从白色念珠菌向低敏感的非白色念珠菌（non-*C. albicans*）的转换[8]。光滑念珠菌很快能对氟康唑及其他唑类耐药，其引起感染的发生率在上升，因而降低了白色念珠菌的发病率[8]。同样，氟康唑的使用导致高度耐药的克柔念珠菌[9]和季也蒙念珠菌（*C. guilliermondii*）的出现[10]。最近，耳念珠菌已成为重要的医院多重耐药菌种[11]。大多数情况下，对氟康唑天然耐药的念珠菌，同时也对更高活性的三唑类如伏立康唑耐药。但在曲霉和其他霉菌中，可以表现为对氟康唑耐药而对高活性的三唑类敏感。然而，已有对高活性三唑类药物耐受的焦曲霉（*A. ustus*）[12]和迟缓曲霉（*A. lentulus*）引起暴发感染的报道，它们对多种抗真菌药物呈现多向耐药性（pleiotropic resistance）[13]。有时，一个敏感菌种发展成一株流行变种，则是耐药菌感染的来源。在细菌界，常可观察到来自一个共同祖先的耐药菌株引起流行。在真菌耐药性方面则很少能观察到这种传播。一个著名的例外是包括耳念珠菌[11]和环境衍生的唑类耐药烟曲霉变种[14]，这些菌株正在全球蔓延[15]。

（三）棘白菌素类

棘白菌素类对大多数念珠菌属具有高度活性，但近平滑念珠菌复合群（*Candida parapsilosis group*）[近平滑念珠菌狭义株（*C. parapsilosis sensu stricto*）、*C. orthopsilosis* 和 *C. metapsilosis*]和季也蒙念珠菌对这类药物的敏感性是先天性降低的[16]。已有报道在治疗过程中发生由这些先天性敏感性降低菌株引起的某些突破性感染（breakthrough infections）[17]。对棘白菌素类药物耐药的迟缓曲霉[13]和耳念珠菌[18]也被报道过。在某些丝状真菌中，如迟缓曲霉、焦曲霉和镰刀菌属，对唑类和棘白菌素类同时耐药，偶尔对多烯类耐药。

（四）多烯类

多烯类药物两性霉素 B 是杀真菌药物，且很少发生耐药。一旦发生耐药，几乎总是由于对先天的敏感性降低菌株（MIC＞$1\mu g/ml$）的选择所引起，这与两性霉素 B 对大多数念珠菌的流行病学界值（epidemiological cutoff values，ECV）相关[19]。尖端赛多孢霉（*Scedosporium apiospermum*）、镰刀菌属（*Fusarium* spp.）、毛孢子菌属（*Trichosporon* spp.）和申克孢子丝菌（*Sporothrix schenckii*）常对两性霉素 B 耐药[7]。已有皱褶念珠菌（*Candida rugosa*）[20]、葡萄牙念珠菌（*Candida lusitaniae*）[21]和热带念珠菌（*Candida tropicalis*）[22]，以及频繁发生的耳念珠菌（*C. auris*）[23]引起突破性感染的报道。在曲霉菌属（*As-*

pergillus spp.）中，已有报道土曲霉（*A. terreus*）[24]、黄曲霉（*A. flavus*）[25]和焦曲霉（*A. ustus*）[26]对两性霉素B存在原发性耐药。

总之，药物压力是一个强有力的选择工具，可导致对抗真菌药物先天敏感性降低的不常见真菌感染。对许多真菌来说，药物不敏感反映了敏感菌株应对药物反应时出现的潜在耐药机制。

二、唑类耐药性

(一)唑类作用机制

唑类通过干扰由ERG11(曲霉中是Cyp51A)编码的羊毛固醇14α-去甲基化酶的作用，从而抑制麦角固醇的生物合成，而后者是真菌细胞膜的主要固醇。虽然已获许可的唑类抗菌药物有很多种(咪唑类和三唑类)，但三唑类药物氟康唑、伏立康唑、伊曲康唑、泊沙康唑和艾沙康唑是最常见的用于预防和治疗侵袭性真菌感染的处方药物。这些药物与靶位的亲和力不同，从而影响它们的活性谱。氟康唑与其靶位的作用最弱，因而表现出最窄的活性谱。它对许多酵母菌具有活性，但对霉菌的活性很差。具有较高活性的三唑类，如伏立康唑、泊沙康唑和艾沙康唑，与去甲基化酶靶位有较强的作用，对酵母菌和霉菌表现出广谱活性，对某些氟康唑耐药菌株也具有活性。氟康唑与伏立康唑化学结构上非常相似，而泊沙康唑和伊曲康唑更接近。正是这种围绕一个核心单元存在适度的化学多样性，促进了交叉反应，有时还促进了交叉敏感性，而这最终取决于耐药机制的本质。

(二)唑类耐药的流行病学

1. 念珠菌属 在抗逆转录病毒的预防性治疗时代，氟康唑作为一个安全有效的抗真菌药物，被广泛用于治疗合并口咽部或食管念珠菌病的HIV感染者，导致了出现耐药性。一项来自40多个国家的多哨点和人群为基础的监测计划，有助于我们对唑类耐药性的了解[27-28]。总体而言，研究证实在敏感菌株中获得性耐药较少(为1%～3%)，而在非白色念珠菌中获得性耐药性更加明显。例如，ARTEMIS DISK全球抗真菌药物监测研究，评估了从1997—2007年41个国家的142个地点的念珠菌临床分离株。在所有的念珠菌分离株中，90.2%对氟康唑敏感，95%对伏立康唑敏感。在128 625株白色念珠菌中，对氟康唑和伏立康唑的耐药率分别为1.4%和1.2%。在23 305株光滑念珠菌临床分离株中，存在较高的耐药比例，对氟康唑和伏立康唑耐药率分别为15.7%和10%。重要的是，光滑念珠菌对唑类的耐药性存呈逐年上升的趋势[29]，而对氟康唑的耐药性因地区而不同[27-28]。

最近的全球性研究证实了低水平的获得性耐药。2014年，台湾酵母菌抗真菌药物监测了1106例念珠菌分离株，其中对氟康唑和伏立康唑的耐药率分别为2.8%和2.2%[30]。意大利的一项研究中包含了1998—2013年394例念珠菌血症，对氟康唑和伏立康唑耐药率分别为5%和2.9%[31]。SENTRY抗菌药物监测项目报道了亚太地区2012—2014年3年念珠菌对氟康唑的耐药率，光滑念珠菌、近平滑念珠菌和热带念珠菌的耐药率分别为6.8%、5.7%和3.6%[32]。中国2009—2013年，念珠菌对氟康唑、伏立康唑和伊曲康唑的耐药率分别为7.6%、3.2%和1.8%[33]。中国南方关于2003—2012年为期9年引起外阴念珠菌病的3181例酵母菌的研究中，白色念珠菌对氟康唑耐药率为1.1%，而非白色念珠菌对氟康唑和伊曲康唑耐药率分别为11.8%和2.5%[34]。唑类耐药在季也蒙念珠菌和克柔念珠菌中较为显著，氟康唑类耐药在近平滑念珠菌、季也蒙念珠菌、葡萄牙念珠菌和菌膜念珠菌(*Candida pelliculosa*)中总体呈上升趋势[35]。南非的医院在2009—2010年间发现，531例近平滑念珠菌分离株对氟康唑和伏立康唑耐药率惊人，高达63%[36]，这与大多数美国机构报道的近平滑念珠菌对氟康唑的低耐药率形成鲜明对比[37]。对于新出现的病原体耳念珠菌，在2012—2015年，来自巴基斯坦、印度、南非和委内瑞拉的54例患者的临床分离物中，发现93%对氟康唑耐药[23]。在发达国家，新型隐球菌对唑类的耐药率普遍较低，而在发展中国家，氟康唑耐药率虽然也很低但更显著[39]。

2. 曲霉菌属 1997年首次报道了对三唑类耐药的烟曲霉，其耐药菌株分离自美国加利福尼亚州使用伊曲康唑治疗的患者[40]。目前，对唑类耐药的烟曲霉在中国、加拿大、美国和欧洲部分国家都有报道。在英国(15%～20%)[41]和荷兰(5%～7%)[42]观察到高耐药情况。对囊性纤维化患者呼吸道定植菌的研究中，发现有近5%曲霉

菌对唑类耐药[43]。ARTEMIS 全球监测计划报道，2008 年和 2009 年的曲霉菌对唑类耐药率为 5.8%[44]。最近的全球监测研究显示，3.2%的烟曲霉分离株对一种或多种唑类耐药[45]。在烟曲霉中唑类耐药性尤其高，是由于其在治疗中获得性耐药和获得了环境中耐药突变株[46-47]。包括美国[48]在内的至少 19 个国家已发现唑类耐药与环境也有关[45]，然而，该耐药率可能低估了曲霉耐药性的全球流行程度，特别是在慢性病人群中。由于烟曲霉在已感染患者中的培养检出率低于 30%，因此对三唑类耐药的确切发生率是未知的。PCR 能更有效的鉴别培养为阴性的呼吸道标本中是否存在烟曲霉，同时还能检测其特征性耐药标记物，该试验证实耐药菌株的实际流行率远高于培养结果所报告的[49]。

三、唑类耐药机制

在过去几十年里，获得性唑类耐药的潜在分子机制得到了广泛研究。阐明耐药性中心的生物机制的早期研究已演变为有说服力的细胞调节机制和通路的描述，这些机制和通路有助于在敏感菌株暴露于药物后调节唑类耐药机制。许多优秀的综述提到这个话题[51-52]。表 133-1 总结了药物耐药的一般机制和细胞效应器。①减低药物-靶位的相互作用；②增加靶位拷贝数；③通过药物外排转运蛋白和减少摄取，从而降低细胞内药物浓度；④其他麦角固醇生物合成途径成分的修饰；⑤生物膜；⑥细胞应激应答和药物耐受性。

表 133-1 抗真菌药物靶位、耐药机制和效应器

抗菌药物	药物靶位	作用模式	耐药机制	耐药效应器
三唑类				
氟康唑	羊毛固醇 14α-去甲基化酶(Erg11，Cyp51A)	阻断麦角固醇生物合成	通过 Erg11(Cyp51A)靶位改变药物亲和力	Upc2，LOH，异倍体
伏立康唑			上调 *ERG11*(*CYP51A*)	Tac1，Mrr1，SrbA，生物膜，*Crz*1，LOH，异倍体
伊曲康唑			上调 *CDR* 和 *MDR* 多药物转运蛋白	
泊沙康唑			其他麦角固醇生物合成基因(*ERG3*)	
艾沙康唑			生物膜；药物摄取	Hsp90，Smi1，Adh5，Csh1，Gca1，Bcr1，Gca2，Rlmp，Fks1
			耐受，异质性耐药	*HSP90* 翻译后修饰
多烯类				
两性霉素 B	结合麦角固醇并形成水性通道	形成大的水性通道	消耗固醇生物膜	
制霉菌素				
棘白菌素类				
卡泊芬净	β-1，3-D-葡聚糖合成酶(Fks1，Fks2)	通过阻断 β-1，3-D-葡聚糖的生物合成改变细胞壁的完整性	葡聚糖生物合成中 Fks1 和(或)Fks2 亚单位的修饰；生物膜；耐受	*MSH2*
米卡芬净				
阿尼芬净				*FKS*，*HSP90*，*CRZ1*，*CHS*，鞘脂类(sphingolipids)
5-氟胞嘧啶(5-FC)	核酸	抑制 DNA/RNA 合成	尿嘧啶焦磷酸化酶(Fur1) 胞嘧啶脱氨酶(Fcy1) 胞嘧啶通透酶(Fcy2)	

注：LOH. 杂合性缺失

揭示这些耐药机制的生物学反应包括导致药物耐受的自适应细胞应答和基因调控元件的修饰。个体机制对耐药发展的相对贡献因属和种而异。在某些临床菌株中，可能存在单一的主导机制，而在其他菌株中，高水平耐药的逐步发展，可能涉及联合耐药机制的相加或协同作用。主要病原菌特定的耐药机制包括多元机制和单个主导机制 2 种。

(一)药物靶位修饰

靶位Erg11p的修饰导致对药物亲和力降低是最直接的耐药机制之一。在唑类耐药的临床分离菌株中,已报道Erg11p中至少有60个氨基酸被取代[52-53]。单个氨基酸取代的影响决定了同类药物中耐药和交叉反应的相对程度。例如,Y132H、K143R、F145L、G450E、G464S、R467K、S405F、G448E、F449V、G450E和G464S可降低真菌对氟康唑和伏立康唑的敏感性[52],但对长链药物伊曲康唑或泊沙康唑的敏感性没有影响。许多ERG11突变对氟康唑耐药的整体贡献是微弱的,而某些突变对唑类耐药表型有轻微的影响[52]。此外,在二倍体白色念珠菌中,核苷酸突变可能会表现为纯合子(2个等位基因)或杂合子(单等位基因)的取代,因而能改变耐药表型。在新型隐球菌中,对氟康唑耐药的菌株,可能在ERG11基因中包含特有的突变[54]。在烟曲霉中,唑类药物靶位羊毛固醇14α-去甲基化酶的修饰,是引起临床耐药的主要机制。已有报道在Cyp51A中获得有限数量氨基酸取代,可赋予真菌三唑类药物多种多样的耐药表型[46,55]。以上所有靶位修饰都可导致菌株对伊曲康唑耐药,另外一些改变也可引起菌株对伏立康唑和泊沙康唑交叉耐药(表133-2)。最常见的修饰发生在氨基酸Gly54、Leu98、Gly138、F219、M220和Gly448上。

表133-2 烟曲霉中Cyp51A氨基酸取代导致三唑类耐药和相关的MIC值[a]

Cyp51A位点	氨基酸取代	MIC(mg/L)		
		伊曲康唑	伏立康唑	泊沙康唑
TR34/L98	H	>8	8	1~2
TR46/Y121/T289	F/A	>16	>16	1~2
F46	Y	>8	2~4	0.125~0.5
G54	E, R, V	>8	0.125~1	1~>8
H147	Y	>8	>8	0.5
M172	V	>8	2~4	0.125~0.5
P216	L	>8	1	1
F219	C	>8	1	1
M220	I, K, T	>8	0.5~4	0.5~>8
N248	T	>8	2	0.25
D255	E	>8	2	0.25
E427	G, K	>8	2~4	0.125~0.5
Y431	C	>8	4	1
G434	C	>8	4	1
G448	S	>8	>8	0.5~1

注:[a]根据参考文献[46]改编;串联重复序列(TR)启动子的名称包括碱基数

(二)环境获得性耐药是一个主要因素

烟曲霉中大多数耐药株是由于Cyp51A中,Leu98密码子突变合并启动子区域一个34bp串联重复序列(TR)[14],而导致菌株对唑类广泛耐药(表133-2)。TR/L98H耐药株的出现,是农业领域中使用唑类药物的后果[56]。这种机制[14]已在欧洲部分地区、印度和亚洲部分地区被发现[57],最近在美国也发现[58],但在治疗的患者中,仅零星的观察到这种耐药株。丹麦2010—2014年唑类耐药率呈上升趋势,其中TR34/L98H占唑类耐药机制的50%[59]。观察到另一个新的TR46/Y121F/T289A机制,进一步表明了耐药选择的环境路径[60]。

(三)耐药的结构模型

在CYP51A和ERG11中的非同义突变,导致羊毛固醇14α-去甲基化酶结构改变,从而降低羊毛固醇14α-去甲基化酶与药物结合。使用相对高分辨率结构模型对Cyp51A和Erg11进行同源性叠加建模,已被用来描述特定氨基酸取代对三唑

类药物与靶酶相互作用的影响[61]。此模型预测相互作用是以各种三唑类药物(例如伏立康唑与泊沙康唑)的不同化学结构特征为基础的。大多数突变都集中在3个热点(hotspot)突变区[62]。导致菌株耐药最主要的氨基酸取代,明显改变了药物与血红蛋白辅因子的相互作用。热带念珠菌的Erg11中K143R的替代是强有效的且对所有唑类耐药[63]。然而,很多来自氟康唑耐药白色念珠菌的Erg11氨基酸取代是无关紧要的,预测其只产生相对较弱的作用和表型结果。在烟曲霉的Cyp51A中,预测可导致菌株对三唑类耐药的氨基酸Gly54、Gly138、Pro216,以及Phe219、Met220和Gly448,位于2个配体进入通道之一的入口邻近位置,而该通道将允许唑类化合物进入酶活性部位[64-65](图133-1)。人们推测通道入口的修饰会干扰与唑类分子的对接。该模型可帮助预测为什么Gly54的修饰会带来对伊曲康唑和泊沙康唑的耐药,而保留对伏立康唑的敏感性。Leu98位于一个部分形成拱形结构的环上,而这种拱形结构在Cyp51蛋白家族成员中高度保守[56,64]。该位置氨基酸替代可能导致配体诱导的不稳定性,这可能是导致强耐药性的原因。在唑类药物中,氟康唑是最弱的抑制剂,而泊沙康唑最强[66]。

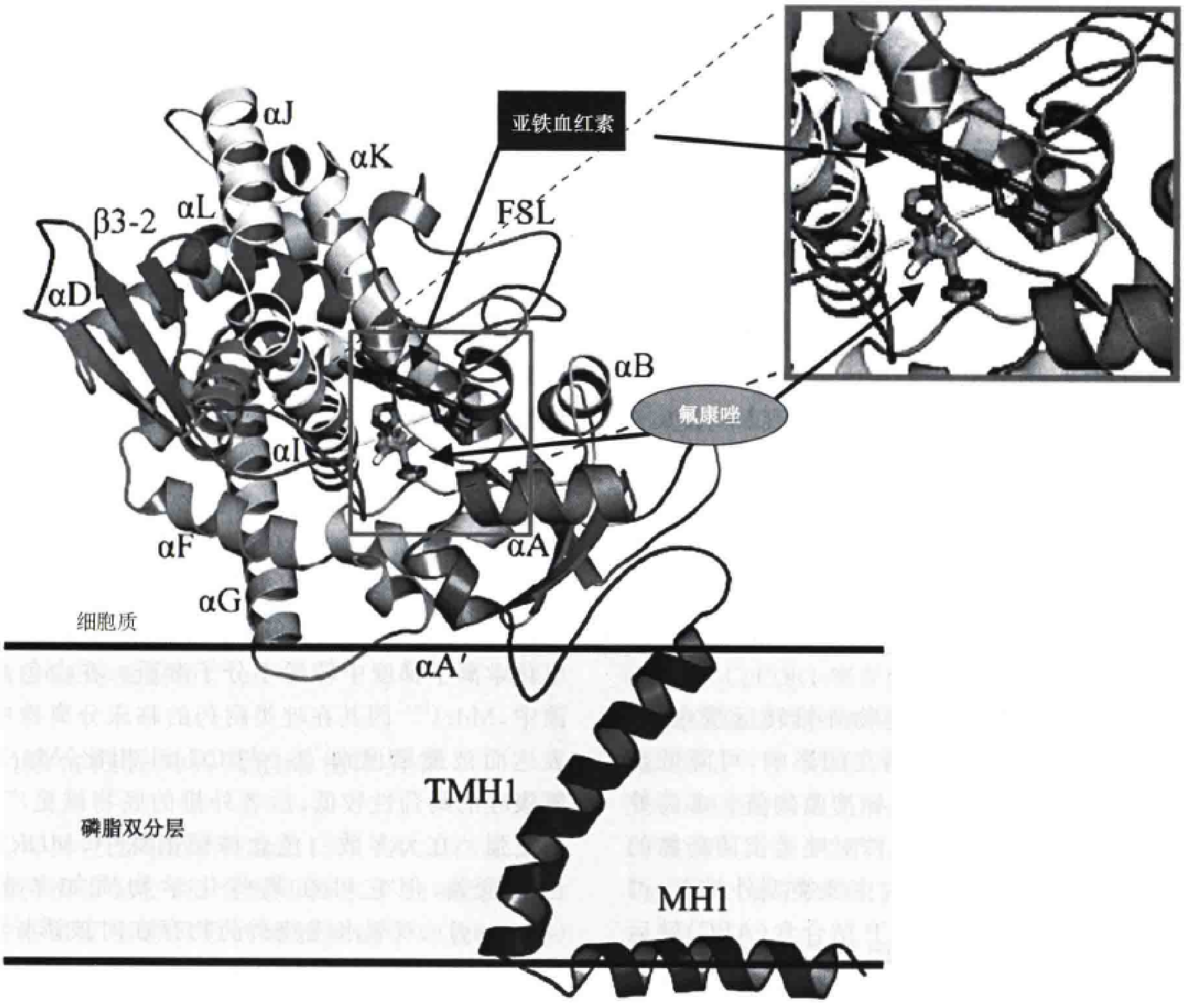


图133-1 Erg11p与氟康唑(FLC)络合的高分辨结构(改编自参考文献[194]),见彩插

(四)增加靶位丰度

羊毛固醇14α-去甲基化酶是麦角固醇生物合成途径中的一个关键酶。为了应答唑类抗真菌药和(或)固醇的损耗,念珠菌菌株可能过度表达ERG11[67]和参与麦角固醇生物合成的其他基因[68]。提高靶位蛋白丰度会降低标准剂量的唑类药物的有效性。启动子区域的顺式作用功能获得

型(cis-acting gain-of-function, GOF)突变或反式作用因子 Upc2p 的改变，可增加 *ERG11* 的表达[69]。白色念珠菌的 Upc2p 是 Zn_2-Cys_6 簇的转录因子，与酿酒酵母 UPC2 和 ECM22 旁系同源[70-71]。Upc2p 是上调 *ERG11* [72]和其他固醇生物合成基因所必需的，以应答固醇的损耗[70-71]。*UPC2* 的突变可导致 *ERG11* 表达的增加，降低真菌对唑类药物的敏感性[69,71]。Upc2p 通过结合到被称为固醇应答元件的保守核心序列，来激活靶基因的转录[70]。在 *ERG2* 和 *ERG3* 的启动子中，存在一个 11bp 的固醇应答元件，Upc2 和 Ecm22 可直接与这个元件相结合。*ERG11* 或 *UPC2* 被诱导过表达，会增加对唑类的耐药性，而缺乏 *UPC2* 突变，表明无 *ERG* 基因诱导，故它们对这类药物非常敏感[71]。当白色念珠菌长时间暴露在唑类药物下，*UPC2* 活性可以增高达 100 倍。*UPC2* 启动子含有一个假定的固醇应答元件[70]，*UPC2* 表达的转录调控是通过 Upc2p 依赖和独立的机制发生的[73]。*UPC2* 突变也可通过影响其他基因的表达增强耐药性，其中包括 *MDR1*，其编码外排转运蛋白[69,74]。对氟康唑耐药性的逐步增强，可能包含 ERG11 固有的高水平表达和药物转运蛋白的过表达[75]。尽管 Cyp51A 和 Cyp51B 的过表达可降低唑类敏感性[76-77]，但关于烟曲霉中 Cyp51A 的调控机制的研究较少，Cyp51A 似乎受 Zn_2-Cys_6 簇转录因子的调节[78]。

(五)降低细胞内药物浓度：药物外排转运蛋白

真菌编码许多假定的药物外排转运蛋白，对唑类抗菌药物敏感性具有潜在的影响，可降低药物有效细胞浓度使其低于目标抑菌阈值。多药外排转运蛋白的过表达赋予菌株对唑类抗菌药物的耐药性[79]。真菌中存在两大主要类型外排泵，可导致其对唑类耐药，包括 ATP 结合盒(ABC)转运蛋白(如 CaCdr1 和 CaCdr2)，其利用 ATP 水解产生的能量运输药物，以及主要协同转运蛋白超家族(MFS)转运蛋白(如 CaMdr1)，其利用细胞质膜电化学梯度转运底物。

ABC 超家族是已知最大的蛋白家族之一。这些蛋白跨越细胞内外膜转运各种各样的底物，包括代谢产物、脂质、固醇和药物。ABC 转运蛋白的一个共同特征是具 2 个不同的结构域，即跨膜结构域和核苷酸结合结构域。白色念珠菌基因组中至少有 27 个基因具有这种拓扑结构的 ABC 结构域[80]。Cdr1 最初被鉴定是一种能转运各种无关的细胞毒性药物的蛋白质，后被证明是白色念珠菌临床分离株中氟康唑耐药的主要决定因素之一[81]。密切相关的转运蛋白 Cdr2 与 Cdr1 之间具有 84%的氨基酸序列同源性，并且对唑类抗真菌药物具有耐药性。在从耐药自然恢复到野生型敏感水平的耐药突变株中，观察到 *CDR2* 的过表达[82]，这表明 *CDR2* 对临床唑类耐药性的影响明显低于 *CDR1*。在光滑念珠菌中，唑类耐药几乎完全是由于 ABC 转运蛋白超家族的过表达，包括 *CgCDR1* [83]、*CgCDR2* (*PDH1*)[84] 和 *CgSNQ2* [85]，而导致对药物外排增强的结果。在光滑念珠菌中，丢失成熟线粒体的小菌落突变子，通过增加 *CgCDR1* 表达和 *CgCDR2* 可能的表达[86]，可变得对唑类耐药。同理，在新型隐球菌中，编码 ABC 转运蛋白的基因 *CnAFR1*，可导致菌株对氟康唑耐药[87]。在克柔念珠菌中，菌株应对唑类药物暴露时，*ABC1* 会被强力上调，因此，它在固有耐药性方面可能发挥了重要作用[88]。烟曲霉中 ABC 转运蛋白基因 *AbcG1*(原来的 *Cdr1B*)过表达与野生型烟曲霉唑类耐药有关，似乎对特定 *Cyp51A* 突变耐药有重要作用[89]。

MFS 转运蛋白占了微生物基因组中编码溶质转运蛋白的 1/2。白色念珠菌基因组中至少包含 95 个可编码 MFS 转运蛋白的可读框[90]。MFS 转运蛋白是单链-多肽次级载体，仅能在应答电化学离子梯度中转运小分子溶质。在白色念珠菌中，Mdr1[91]因其在唑类耐药的临床分离株中过表达而被最早识别[79]。与 CCdr1 相比，Mdr1 对氟康唑的耐药性较低，后者外排的底物谱更广、能力更强。在大多数白色念珠菌菌株中，*MDR1* 表达不显著，但它可在某些化学物质如苯菌灵(benomyl)、双氧水或唑类药物存在时被诱导[92]。另一种 MFS 转运蛋白 Flu1，能导致菌株对氟康唑耐药。然而，在唑类敏感和耐药的白色念珠菌临床分离株中，FLU1 表达存在差异，因此，在临床耐药性中，它似乎不是一个重要因素[93]。

总之，不同药物外排转运蛋白对唑类耐药的相对贡献随转运蛋白的表达水平和类型而变化。总的来说，白色念珠菌中高水平唑类耐药常与 *CDR1* 过表达相关。然而，已经从暴露于唑类抗菌药物患者连续

分离的菌株中证实，多因素耐药的逐步发展与药物暴露、*CDR* 和(或)*MDR* 基因表达[94-95]及其他机制(如 *ERG11* 过表达或特定 *ERG1* 突变)有关。同理，烟曲霉中的 AbcG1 对耐药的贡献尚不明确，而非 Cyp51A 代替的三唑类耐药机制可能涉及其他转运蛋白或未知机制[41,89]。

(六)唑类耐药的调节

潜在的过表达调节机制是唑类耐药表型发展的一个重要组成部分。近年来研究的一个主要重点是了解控制这些基因表达的调节通路上。对于白色念珠菌和其他念珠菌，已证实在锌簇转录因子 Tac1 和 Mrr1 中，激活 GOF 突变可分别调节 *CDR* 和 *MDR* 基因的表达[96-97]。*TAC1* 上的特异性突变介导编码 ABC 转运蛋白 CDR1 和 CDR2 的基因过表达[96,98]，而在唑类耐药分离株中，Mrr1 调节 MFS 转运蛋白 Mdr1[99]。在光滑念珠菌中，CgPdr1p 是一个 Zn_2-Cys_6 转录因子，参与 ABC 转运蛋白基因 CgCDR1、CgCDR2 和 CgSNQ2 的调节[100]。

在 *CgPDR1* 中 GOF 突变可致 ABC 转运蛋白固有地高表达[101-102]，一个显著特征是来自于唑类耐药临床分离株的 *CgPDR1* 等位基因中，表现非常高的多样性，目前已鉴定的非同义取代超过 65 个[102]。最后，mRNA 的稳定性是一个重要的因素，它有助于信息的稳定及在唑类耐药白色念珠菌分离株中 *CDR1* 持续性过表达[103]。烟曲霉中，相关 Zn_2-Cys_6 簇转录因子(AtrR)通过调节 Cyp51 和 AbcG1 导致耐药[78]。

(七)杂合性丢失和其他染色体异常

当白色念珠菌的 ERG11 和 TAC1 存在上调和(或)携带突变时，会发生高水平的唑类耐药。这些基因发生拷贝数的增加是由于杂合性丢失(loss of heterozygosity，LOH)的结果。*TAC1* 与 *ERG11* 一起位于第 5 号染色体(Chr5)，Chr5 的重排不仅导致 *TAC1* 纯合，而且可引起 Chr5 其他区域的杂合性丢失，包括 *ERG11* 位点[104]。最后，Chr5 上的节段异倍性也可导致唑类耐药，其通过形成等臂染色体 5L[i(5L)]而增加 TAC1、MTL 和 ERG11 的拷贝数引起[98,105]。这种遗传可塑性为白色念珠菌提供了对唑类药物动态反应，此现象在临床耐药株中普遍存在[106]。通常，耐药的发生被推测是由一个耐药细胞克隆群内部反映出来的，然而有些菌株表现出异质性耐药，即药物在耐药细胞群反应的可变性，这种菌株通常不能被常规药敏试验所发现，可能与治疗失败有关[107]。在新型隐球菌和光滑念珠菌中，对氟康唑的异质性耐药是唑类耐药的一种适应模式[107-108]。异质性耐药细胞群体对药物的反应存在差异，通过自我调节逐步适应更高浓度的药物。适应氟康唑的新型隐球菌常含有二体型 Chr1。Chr1 的复制导致基因 *ERG11* 和主要转运蛋白 Afr1 的过表达[109]。当药物不存在时，菌株可通过丢失 Chr1 的额外拷贝，随后丢失剩余二体型染色体的额外拷贝，而恢复到基础水平的敏感性。

(八)唑类耐药与毒力

获得性耐药可能与其适应性(fitness)或毒力的丢失有关。在白色念珠菌中，Mrr1、Tac1 和 Upc2 中 GOF 突变导致耐药，似乎会带来一个适应性代价(fitness cost)，表明药物泵的调节是由细胞严格控制的[100]。在烟曲霉中，唑类耐药可以改变毒力[76,111]。毒力的缺失表明耐药菌株在巨大的高度适应的野生型菌株库中应是自限性的。但是，在携带 Cyp51A 缺陷的 L98H/TR 和 TR46/Y121F/T289A 型菌株中并非如此，由于其保持着细胞的适应性和毒力，表现为感染菌株的广泛传播。与其他机制相比，光滑念珠菌转录因子 PDR1 中 GOF 突变，以促进毒力增加的方式调节与宿主的相互作用[102]。这类 GOF CgPDR1 突变降低了菌株对巨噬细胞的黏附，并避免被其吞噬，从而可逃避宿主的先天性细胞免疫应答[112]。同样，在线粒体 DNA 缺陷(小菌落突变子)唑类耐药的光滑念珠菌株中，观察到毒力增强的现象，其上调了 ABC 转运蛋白基因 CDR1 *CgCDR1*、*CgCDR2* 和 *CgSNQ2*[113]。

(九)其他 ERG 基因及机制

ERG3 编码固醇 $\Delta^{5,6}$-去饱和酶，有助于固醇的生物合成。唑类药物暴露导致 14α-甲基固醇和 14α-甲基麦角固醇-8,24(28)-二亚乙基三胺-3,6-二醇的累积，通过固醇 $\Delta^{5,6}$-去饱和酶催化，形成后者固醇代谢物。失活的 *ERG3* 可抑制菌株的毒力，从而促进唑类耐药[114]。已被证明在唑类和两性霉素 B 耐药的白色念珠菌临床分离株中，存在

固醇损耗和*ERG3*缺陷[115]。然而，失活的*ERG3*并不总是导致唑类耐药，因为在光滑念珠菌中一个无效的*ERG3*突变，不导致菌株对唑类耐药[116]，在烟曲霉中，ERG3(A/B)的破坏对唑类敏感性没有影响[117]，最后唑类摄取可能受特定转运蛋白调节，尽管还未有临床发现，损伤这种转运蛋白可能会导致耐药[118]。

(十)生物膜

生物膜是微生物自然生长最普遍的形式之一，它们常抵抗抗菌药物。念珠菌是酵母相关生物膜感染中最常见的病原体[119]，而白色念珠菌是最主要的真菌性生物膜产生菌[120]。其他酵母和丝状真菌是重要的生物膜产生菌，包括其他念珠菌、隐球菌、芽生裂殖菌、毛孢子菌、肺孢子菌、酵母菌、曲霉和球孢子菌[120]。生物膜结构类似一张密集的网，由酵母和丝状真菌细胞嵌入由糖类、蛋白质和核酸组成的聚合物基质中构成。复杂的细胞外生物膜基质组织，是区分浮游细胞和生物膜的一个主要特征(图 133-2)。



图 133-2 生物膜组成和影响药物水平的耐药机制示意图(改编自参考文献[177])，见彩插

念珠菌生物膜对唑类药物如氟康唑固有耐药。念珠菌生物膜对唑类和其他药物的耐药机制是多因素的，涉及药物外排转运蛋白的诱导和药物在大量的基质结构内的隔离[120-121](图 133-2)。在生物膜里，药物外排转运蛋白基因*CDR*和*MDR*在生物膜形成过程中被上调[122-123]。然而，大部分多重耐药表型，是通过细胞外基质对药物隔离所引起[124]。白色念珠菌基质的一个关键成分是β-1,3-D-葡聚糖，它是由葡聚糖合成酶所产生，其关键基因负责基质中β-1,3-D-葡聚糖的传递和排列[124-125]。细胞外的葡聚糖帮助隔离药物，从而降低到达细胞的有效药物浓度[126](图 133-2)。其他细胞内蛋白，如乙醇脱氢酶 Adh5、Csh1 和 Ifd6，以及葡萄糖淀粉酶 CaGCA1 和 CaGCA2，在基质产生和耐药表型中发挥作用[127]。热休克蛋白 90(Hsp90)是一种保守和必不可少的分子伴侣，通过稳定许多参与信号转导的受体蛋白调节细胞信号[128]。这对生物膜的健康很重要，因为在白色念珠菌中，它的损耗将减缓生物膜的生长和成熟，并导致生物膜受损分散，从而降低对唑类抗菌药物的耐药性[129]。通过遗传学或药理学方法损伤 Hsp90 功能，使氟康唑能够有效消除体内对唑类不敏感的生物膜[129]。

总的来说，基质生产受到高度调控，并构成了念珠菌属[130]和曲霉菌属[131]一个关键的耐药因素。

四、棘白菌素类耐药机制

(一)棘白菌素类抗菌药物

棘白菌素类药物阿尼芬净、卡泊芬净和米卡芬净属于脂肽类，靶向抑制葡聚糖合成酶，此酶主要负责β-1,3-D-葡聚糖的生物合成。棘白菌素类是目前治疗侵袭性念珠菌病的一线抗菌药物[132]。棘白菌素的靶位β-1,3-D-葡聚糖合成酶由一个催

化单位 FKs 和调节物质 Rho 组成。催化亚基 FKS 由 3 个相关基因*FKS1*、*FKS2* 和*FKS3* 编码。*FKS1* 基因在白色念珠菌[133]和其他念珠菌中是必需的，但在光滑念珠菌中，*FKS1* 和*FKS2* 在功能上是冗余的[134]。棘白菌素类药物在体外显示对敏感的念珠菌具有杀菌活性[135]，然而它们对霉菌仅有抑菌活性，可裂解某些生长中菌丝的末端，但不能完全阻断细胞生长[136]。棘白菌素类药物通常对侵袭性接合菌、隐球菌属或镰刀菌无效。重要的是，对棘白菌素类耐药的菌株未表现出对其他抗菌药物的交叉耐药性，棘白菌素类对唑类耐药的酵母和某些形成生物膜的念珠菌是有效的。

(二)棘白菌素类耐药流行病学

对棘白菌素类耐药的念珠菌分离株越来越多，虽然其在白色念珠菌和其他大多数念珠菌中的发生率仍相对较低(1%～3%)[137-139]，据报道，耳念珠菌的耐药性已达到 7%[23]。但光滑念珠菌是一个例外，其耐药性日益严重，常伴随多重耐药[140]。棘白菌素及唑类药物的广泛使用，已引起流行病学的改变，即光滑念珠菌在某些保健中心已成为主要的真菌血症病原体[141]。耐药性的产生可出现于延长治疗之后[142]，甚至发生在治疗早期[143]。SENTRY 抗菌药物监测项目(SENTRY Antimicrobial Surveillance Program)报道，2006—2010 年分离的 1669 例血液感染的光滑念珠菌中，棘白菌素类耐药率从 8.0% 升至 9.3%[29]。此外，在一项长达 10 年，包含 293 个光滑念珠菌血液感染案例的研究中，光滑念珠菌对棘白菌素类耐药率，从 2001—2006 年的 2%～3% 升至 2009—2010 年的>13%[143]。最近一项涉及四大都市 80 家医院为期 6 年共计 1385 例光滑念珠菌的分析中，其中耐药菌株占 6%，耐药分离株所占比例从 2008 年的 4.2%增长到 2014 年的 7.8%。令人震惊的是 59%的耐药菌株没有已知的棘白菌素类暴露史，这说明可能存在传播[144]。

在欧洲一个大范围监测项目显示，耐药性存在区域差异，并且亚太地区报道了非常低水平的棘白菌素耐药。

(三)FKS 耐药机制

导致突破性感染的临床耐药涉及葡聚糖合成酶 Fks 亚基的修饰，以及反映这一潜在机制的临床折点[146]。与唑类抗菌药物不同，棘白菌素类药物不是多药转运蛋白的底物[147]。棘白菌素类耐药性由 Fks 亚基上特殊的氨基酸取代所引起，可导致 MIC 值升高[148]，并使葡聚糖合成酶对药物的敏感性降低(IC50)50～3000 倍[149]。在白色念珠菌和大多数其他念珠菌中，突变发生在*FKS1* 的 2 个高度保守的热点区域(hot-spot)。在光滑念珠菌中，Fks1 和 Fks2 的等效氨基酸替换使其产生耐药性(图 133-3)。这些有限的区域包括了残基(白色念珠菌)Phe641-Pro649 和 Arg1361[150]。对于白色念珠菌，在 Ser645 和 Ser641 位置的氨基酸改变是最常见的(约 90%)，可引起最明显的耐药表型[151-152]。在光滑念珠菌中，*FKS1* 和*FKS2* 都发生了类似的耐药突变，其中 S629P、F625S、D632E (FKS1)和 S663P、F 或 Y 和 F659S 或 V (FKS2)是最著名的氨基酸替代[151,153]。通过 *FKS*1 或 *FKS*2 上热点区突变所致的对于棘白菌素的耐药水平，也取决于该基因的相对表达，其差异可超过 20 倍[154]。*FKS2* 表达是钙调磷酸酶依赖性的，并被 FK506 下调[155]。由 *FKS*2 而非 *FKS*1 引起的耐药性，可通过使用钙调磷酸酶抑制药 FK506 治疗后逆转[134]。最近，可赋予体外耐药性的第 3 个热点区域被确认，其为酿酒酵母 Fks1 的 W695 及分别来自赛多孢菌和粟酒裂殖酵母(*Schizosaccharomyces pombe*)的等价(equivalent)残基 F695 和 W760[156]，但它耐药的临床表现尚不明确。最后，白色念珠菌 FKS1 中氨基酸取代，很可能导致自身适应环境能力的下降[134,154]，因为常导致葡聚糖生物合成催化反应最大速率的降低[154]，从而造成细胞壁形态学的改变[157]。适应环境能力下降的后果是，棘白菌素类耐药菌株难以与其野生型菌株相抗争[157]，这有助于解释为何该耐药性与全新获得的耐药相关，而与传播无关。

(四)热点多态性与固有敏感性降低

相对于其他高度敏感的念珠菌，近平滑念珠菌复合群(近平滑念珠菌狭义株、*C. orthopsilosis* 和 *C. metapsilosis*)和季也蒙念珠菌显示出更高的棘白菌素类 MIC 值(0.5～8.0 μg/ml)，而耐药折点可反映这种固有敏感性降低[146]。固有敏感性降低的临床表现还不清楚，因为感染这些菌株的患者常被标准剂量的棘白菌素类药物成功治

愈[158]，虽然临床疗效可因患者人群而有所不同[17,159]。导致棘白菌素类敏感性降低的机制似乎是在FKS热点区域自然存在的多态性，导致葡聚糖合成酶对药物敏感性中等程度降低[160]。在近平滑念珠菌复合群中，位于热点1(Pro660)远端边缘高度保守的脯氨酸，以一个丙氨酸的形式出现(图133-3)。总之，Fks1的多态性似乎天然存在于非白色念珠菌和其他真菌中，导致菌株对棘白菌素类药物的敏感性降低。

微生物	Fks1 热点1	Fks1 热点2	Fks2 热点1	Fks2 热点2	Fks3 热点1
白色念珠菌	F_{641}LTLSLRDP	DWIRRYTL	NO	NO	NO
克柔念珠菌	F_{655}LILSIRDP	DWIRRYTL	NO	NO	NO
光滑念珠菌	F_{625}LILSIRDP	DWIRRYTL	F_{659}LILSLRDP	DWIRRYTL	NO
季也蒙毕赤酵母菌	F_{632}MALSIRDP	DWIRRYTL	NO	NO	NO
解脂假丝酵母菌	F_{662}LILSIRDP	DWIRRCVL	NO	NO	NO
热带念珠菌	F___LTLSIRDP	DWIRRYTL	NO	NO	NO
都柏林念珠菌	F_{641}LTLSIRDP	DWIRRYTL	NO	NO	NO
近平滑假丝酵母菌*	F_{652}LTLSIRDA	DWIRRYTL	NO	NO	NO
拟平滑假丝酵母菌	F___LTLSIRDA	DWVRRYTL	NO	NO	NO
似平滑念珠菌	F___LTLSIRDA	DWIRRYTL	NO	NO	NO

NO：未观察到　　*近平滑念珠菌狭义株　　----不完整序列名称

获得性突变强耐药　　获得性突变弱耐药　　自然发生的多态性

图133-3 在念珠菌临床分离株中Fks氨基酸取代和热点区域多态性使其对棘白菌素类药物敏感性降低，见彩插

(五)生物膜

与唑类耐药一样，葡聚糖基质起到隔离棘白菌素类药物的作用，阻止药物到达细胞膜。可通过对β-1,3-D-葡聚糖合成酶的遗传或化学修饰破坏这个过程，从而减少基质中的药物隔离，致使生物膜对抗菌药物敏感[125]。上述机制解释了生物膜生长期间，很大一部分的耐药表型[161]，它也是在药物存在的情况下，观察到持留细胞的一个因素。如Bcr1转录因子控制着生物膜形成[162]和*SMI1*在生物膜基质葡聚糖的产物及之后耐药表型的发展[125]。

五、多烯类耐药机制

1957年，在美国两性霉素B是第一个批准用于治疗可能威胁生命的侵袭性真菌感染的抗菌药物[163]。多烯类药物与细胞膜中真菌特异的麦角固醇相互作用，产生浓度依赖的高电导通道，允许离子或其他细胞成分流出细胞，从而导致细胞死亡。几十年来，两性霉素B是一直是治疗侵袭性真菌感染，包括侵袭性曲霉菌病、隐球菌病、芽生菌病、念珠菌血症、球孢子菌病、组织胞浆菌病和毛霉菌病的主要药物。然而，其与固醇类如动物细胞膜中的胆固醇亲和性会导致肾毒性，因此，它被列为二线抗菌药物。两性霉素B脂类剂型克服了这个最严重的局限性，但仍然受到成本和潜在毒性的影响。

(一)耐药流行病学

对多烯类药物的屈光(refractive)治疗反应，通常涉及先天不敏感的真菌如土曲霉(*A. terreus*)、波氏假阿利什菌(*Pseudallescheria boydii*)、赛多孢霉(*Scedosporium* spp.)、淡紫紫孢菌(*Purpureocillium lilacinum*)和镰刀菌属[164-166]。敏感菌种的耐药通常<1%，而35%的耳念珠菌分离株对两性霉素B耐药[23]，对多烯类耐药的曲霉发生率低，>98%的烟曲霉分离株在1 μg/ml时被抑制[167]。不常见的曲霉，如焦曲霉和迟缓曲霉[13,166]，对两性霉素B和其他抗真菌药物高度耐药。对于酵母菌，尽管在白色念珠菌、克柔念珠

菌、皱褶念珠菌（*C. rugosa*）[20]、葡萄芽念珠菌[21]和光滑念珠菌中，已报道对两性霉素 B 有较高的 MIC 值和（或）较差的治疗效果[168-169]，但隐球菌和念珠菌对多烯类药物获得性耐药是罕见的。最近几年，光滑念珠菌中一个多重耐药表型中包括两性霉素的获得性耐药[170]。

（二）多烯类耐药机制

对两性霉素 B 的耐药机制通常涉及细胞膜中麦角固醇含量的降低。事先暴露菌株于一种唑类药物，可以降低细胞固醇水平，从而造成真菌对多烯类药物稳定性耐药[171]。在酵母中对两性霉素 B 获得性耐药已被广泛评估。具有固醇通路基因 *ERG1*、*ERG2*、*ERG3*、*ERG4*、*ERG6* 和 *ERG11* 缺陷的酵母菌突变株，由于麦角固醇耗尽，从而赋予其对多烯类药物不同的耐药水平[115,168,172]。在隐球菌中，具有 C8-异构酶活性缺陷和固醇含量降低的菌株，表现出对多烯类药物的敏感性降低[173]。在白色念珠菌中，发现对唑类抗菌药物和两性霉素 B 均耐药的临床和实验室菌株存在 *ERG3* 和 *ERG6* 缺陷[116,174-175]。然而，在烟曲霉中，即使整体固醇含量降低[117]，*ERG3* 的缺失也未改变对两性霉素 B 的敏感性。在曲霉中，对两性霉素 B 的耐药性似乎更复杂，很可能涉及其他机制[176]。生物膜形成是限制药物进入菌体内的一个重要因素，因为高疏水性药物被限制在广泛的葡聚糖基质中[177]。

六、5-氟胞嘧啶耐药机制

5-氟胞嘧啶（5-FC）是一种前体药物，当其被细胞摄取后，可由表达胞嘧啶脱氨酶的微生物代谢，生成一种有毒的物质，从而干扰 DNA 和蛋白质的合成。由于 5-氟胞嘧啶针对的是一个非必要的补救途径，具有使真菌细胞发展为耐药的高倾向，因此，5-氟胞嘧啶一般会与其他抗真菌药物（如两性霉素或氟康唑）联合给药。在酵母中，无论是胞嘧啶脱氨酶或尿嘧啶磷酸核糖转移酶（UPRTase）的活性降低，都起着重要作用。在白色念珠菌中，*FUR1* 基因（尿嘧啶焦磷酸化酶）核苷酸多态性可导致其对 5-氟胞嘧啶耐药，并在临床耐药中起重要作用[178]。在葡萄牙念珠菌中，*FCY2*（胞嘧啶通透酶）、*FCY1*（胞嘧啶脱氨酶）和 *FUR1* 基因的失活，导致了对 5-氟胞嘧啶的不同耐药性[179]。在光滑念珠菌中，高水平 5-氟胞嘧啶耐药是由广泛的突变引起 *FCY1* 或 *FUR1* 缺失表型（null phenotypes）所导致，而低水平耐药则是由一个或更多的 *FCY2* 通透酶基因突变所引起[180]。在光滑念珠菌中，甘油水通道编码的基因 *CgFPS1* 和 *CgFPS2* 通过减少细胞内药物累积调节 5-氟胞嘧啶耐药[181]。

七、微生物耐药的驱动因素：药物适应和药物逃逸

药物敏感细胞向耐药突变的转化需要 1 种或多种耐药机制。导致基因稳定逃逸突变的途径是一个多相的过程（图 133-4）。最初，接触药物的细胞会产生应激反应，从而诱导保护细胞亚群的适应性细胞通路[182]。这些细胞对药物具有耐受性，这使得它们能够发展出基因稳定的耐药机制，增加体外 MIC 值并促进逃逸[183]。促进细胞耐药的机制是多种多样的（图 133-5）。Hsp90 是一种细胞应激调节剂，在促进念珠菌的细胞适应，特别是对唑类药物的适应中发挥作用[184]。*破坏* Hsp90 的表达下调可以阻止唑类耐药的出现[185]。棘白菌素类抑制葡聚糖生物合成会诱导应激-耐受通路，包括细胞壁完整性、PKC、Ca^{2+} 钙调磷酸酶-Crz1 和 *HOG*[186]（图 133-5）。此外，调节神经脂质生物合成可导致菌株出现混合表型，即菌株对卡泊芬净耐药而对米卡芬净高度敏感[187]。Hsp90 可通过其主要蛋白受体钙调磷酸酶及其下游效应器 Crzl 帮助协调对棘白菌素类耐药[188]。棘白菌素类作用也可导致几丁质合成的代偿性升高。几丁质含量高的细胞壁突变对卡泊芬净敏感性降低[189]。在非常高的药物水平上的反常生长[190]，也与几丁质生物合成的补偿反应有关[191]。异质性耐药可能是由不可遗传的表观遗传事件引起的，这种表观遗传事件导致克隆群体中 MICs 的变异。

总的来说，适应性反应使细胞在药物作用下保持稳定，从而产生耐药细胞群。药物耐受的结果是一种生理状态，通过形成稳定的突变（如 *FKS*）使细胞突破药物作用。最近有研究表明，由于 DNA 错配修复中的缺陷，超过 50% 的光滑念珠菌临床分离株携带突变表型，从而增加了自发突变率，导致快速诱导耐药[175]。这一机制对任何

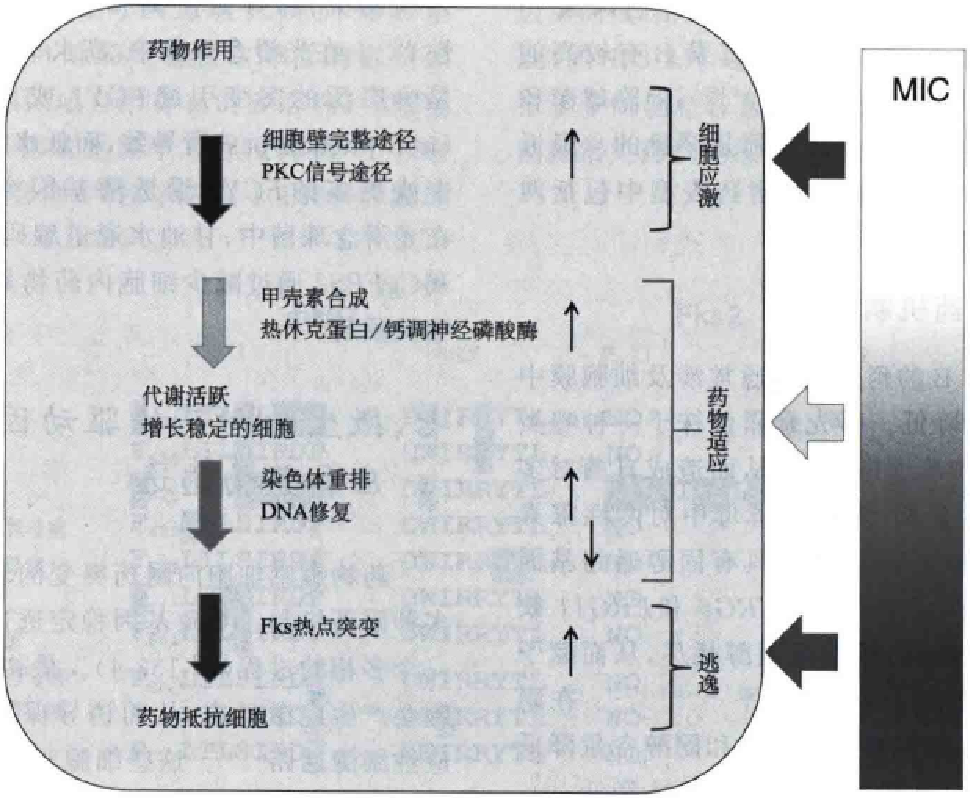


图 133-4 耐药性的演变。药物作用导致细胞应激，该应激通过细胞膜和(或)细胞壁受体激活下游机制，从而稳定一部分细胞，导致药物适应和体外 MICs 升高。随着时间的流逝，细胞会发展出特征明确的机制，从而导致药物逃逸和临床耐药性，见彩插

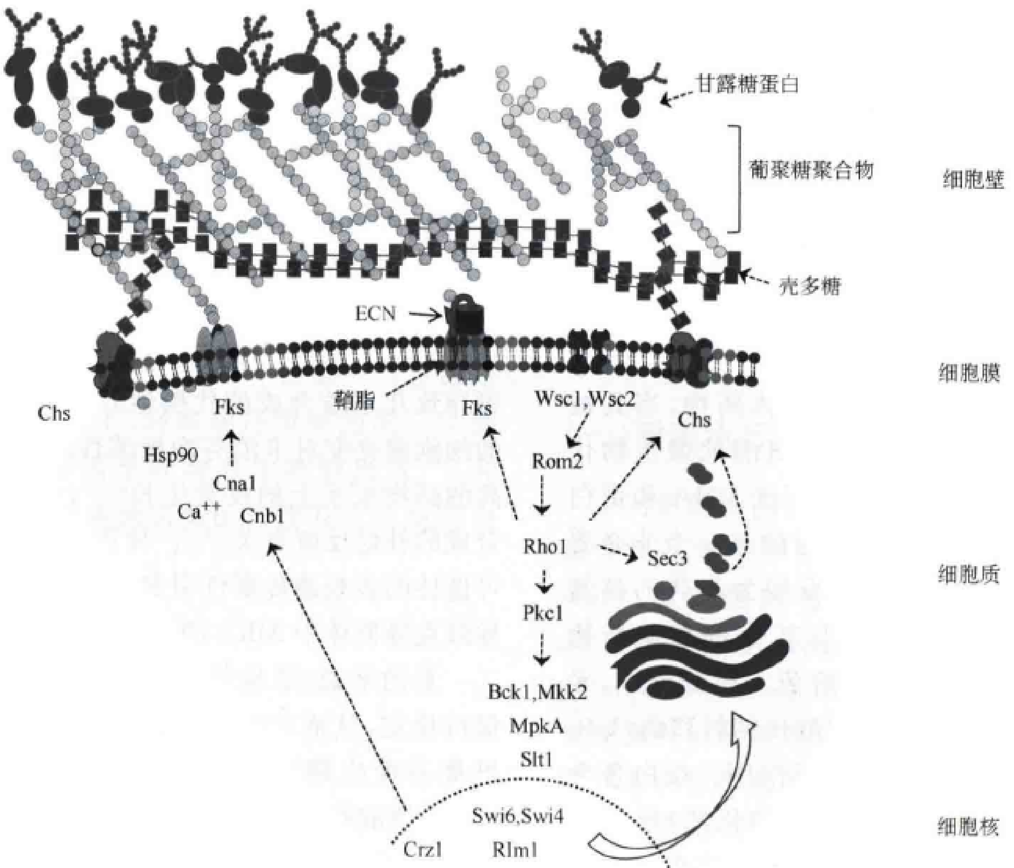


图 133-5 棘白菌素类药物抑制葡聚糖合成酶(Fks)诱导细胞产生细胞壁应激和耐药性的主要过程示意图，见彩插

药物类别均无特异性，因为它可以促进唑类、棘白菌素类和多烯类耐药。在某些情况下，它似乎是多药耐药性发展的一个促进因素[192]。值得注意的是，获得性耐药并不总是伴随着适应度成本。例如，在光滑念珠菌中，具有唑类耐药性的转录因子 PDR1 中的 GOF 突变与毒力的增强相关[193]。

八、总结与展望

由于真菌感染的全球负担上升，抗真菌治疗仍是患者管理的一项重要内容。然而，由于抗菌药物种类有限和真菌耐药性的出现，治疗的选择仍受到限制。引起耐药的机制已经研究得很透彻，包括通过靶位的修饰（药物亲和力变化或靶位丰度）或减少细胞内有效的药物含量（通过 ABC 或 MFS 药物泵，生物膜葡聚糖缺陷）来降低药物-靶位的相互作用。白色念珠菌显示了一个完整的耐药机制，尽管有这种遗传潜力，但并非在所有的真菌中都包含所有耐药机制。例如，在光滑念珠菌对唑类耐药中，转运蛋白基因的表达比靶位点突变更重要。相反，在所有念珠菌中，棘白菌素类耐药都依赖于靶位点突变的发生，而药物泵不起作用。在曲霉中，唑类耐药受靶位点突变的影响最大，而在某些菌株中，药物泵和未知机制可能发挥重要作用。对于影响药物靶基因 *ERG11* 和 *FKS* 表达的基因调控元件，以及 ABC 和 MFS 转运蛋白的研究已经很多。在某些菌株中，转录因子的点突变足以上调表达，而在其他菌株中，染色体的大范围变化，包括等臂染色体形成才能改变转录谱。异质耐药性已成为调节细胞对药物敏感性的一种重要的瞬时机制，尤其是对唑类药物的敏感性。

真菌细胞是高度动态的，以适应环境的挑战，抗菌药物亦是如此。生物膜将正常敏感的浮游细胞转变为高度耐药的细胞群，并产生传播耐药性的持留细胞。代偿机制，例如，棘白菌素抑制葡聚糖合成酶，从而引起几丁质生物合成增强，这有助于确保细胞壁的完整性。此外，广泛的细胞应激反应通路有助于细胞的稳定和药物适应的持留细胞发展，这些细胞有可能通过诱导永久耐药机制逃避治疗。

为了开发新的更容易识别耐药性的诊断方法，以及创建新的治疗干预策略，预防和克服耐药性，详细了解主要耐药机制及其演变发挥作用的因素显得非常重要。目前分子诊断工具的发展，使快速确定属和种变得非常可行，同时评估引起耐药的基因突变。此外，通过干扰适应性反应，开发出联合的药物治疗方案，以克服和预防真菌耐药性的产生。

参考文献请扫二维码查阅

第 134 章 抗真菌药物和敏感性试验方法：酵母菌和丝状真菌*

ELIZABETH M. JOHNSON，MAIKEN CAVLING-ARENDRUP

（曹敬荣 译；陈宏斌、芮勇宇 审校）

一、抗真菌药物敏感性试验

（一）概述

目前，批准用于侵袭性真菌感染系统性治疗的抗菌药物包括：①多烯类的两性霉素 B 及其 3 种脂质体剂型；②唑类的氟康唑、伊曲康唑、酮康唑、泊沙康唑和伏立康唑；③棘白菌素类的阿尼芬净、卡泊芬净和米卡芬净；④嘧啶类的氟胞嘧啶；⑤丙烯胺类的特比萘芬（第 132 章）。随着上述抗菌药物使用的增加，发现某些酵母菌和霉菌对一种或多种抗菌药物固有耐药现象[1-9]，治疗过程中出现的耐药性也被发现。此外，由于农业生产中唑类药物的使用，烟曲霉（*Aspergillus fumigatus*）对临床治疗用的三唑类药物交叉耐药现象令人担忧。光滑念珠菌在棘白菌素类治疗过程中出现获得性耐药，耳念珠菌作为新的全球威胁，通常对氟康唑耐药，并且易于对其他抗菌药物形成耐药，并相继在 5 个州的医疗机构重症监护室引起大规模的院感暴发[10-11]。因此，在抗菌药物选择和监测过程中，要求临床实验室发挥更大的作用。准确预测性的真菌敏感性试验对临床至关重要，目前已作为治疗决策的有效辅助工具广泛应用于侵袭性真菌感染患者管理决策中，在临床管理决策指南中，该试验也开始被推荐[12-13]。

适用于临床的体外抗菌药物敏感性试验应该具备以下条件：①提供可重复和可靠的结果指示抗菌药物活性；②检测的结果应与体内活性一致，有助于预测治疗结果；③通过运用临床折点检测治疗过程中耐药性的发展；④作为一种监测工具，采用种特异的流行病学临界值（ECOFFs/ECVs）监测敏感野生型菌株耐药机制的发展；⑤具有筛选工具价值，预测新研发药物的治疗潜能。为了提供以上信息，需要仔细分析药物的药动学和药效学及宿主和病原菌之间的相互作用。20 世纪 90 年代早期，美国临床实验室标准化委员会（National Committee for Clinical Laboratory Standards，NCCLS）首次将标准的肉汤稀释法引入抗真菌药敏试验中（NCCLS M27-P）[14]，至今为止，标准的肉汤稀释法仍是抗真菌药敏试验的基本参考方法，包括后来修订的微量肉汤稀释法（CLSI M27-A3）[15]。临床和实验室标准化委员会（CLSI）抗真菌药敏试验分会和欧洲临床微生物学与感染病学会（European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases，ESCMID）、欧洲抗菌药物敏感性试验委员会（European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing，EUCAST）下属的抗真菌药敏试验分会（Subcommittee on Antifungal Susceptibility Testing，AFST）建立和发布了公认的抗真菌药敏试验参考方法[14-20]。CLSI 分会研发了酵母菌（CLSI M27-A3 文件）和丝状真菌（CLSI M38-A2 文件）宏量和微量肉汤稀释法药敏试验的参考方法，以及酵母菌（CLSI M44-A2 文件）和丝状真菌（CLSI M51-A 文件）纸片扩散法真菌药敏试验[15-16，19-20]，而 EUCAST 研发了发酵酵母菌（E. Def 7.3 文件）和形成分生孢子丝状真菌（E. Def 9.3 文件）的微量肉汤稀释法真菌药敏试验[17-18]。EUCAST 和 CLSI 参考方法的主要差别是 EUCAST 推荐高浓度葡萄糖、高接种浓度孵育，对酵母菌需要短孵育时间

*本章包含 E. M. Johnson、A. Espinel-Ingroff 和 M. A. Pfaller 在本手册第 11 版第 131 章中呈现的部分内容

和分光光度计读取结果，而 CLSI 推荐孵育 2 天并肉眼判读结果。然而，随着这些方法的广泛使用，以及人们对它们影响因素更多的了解，已经出现一些变化。最近，CLSI M27 方法[15]与 EUCAST 参考方法[17]对酵母菌敏感性试验结论一致：对大多数酵母菌来说，氟康唑、两性霉素 B 和棘白菌素类的测定结果在孵育 24 h 后即可观察到，因此，结果读取总时间由 72 h 减少到 48 h[15,21-23]。研究结果也表明，泊沙康唑和伏立康唑对念珠菌 MICs 的读取时间与 EUCAST 方法一致，也是 24 h[24]。

近来最突出的进展是为系统性抗真菌药物建立了种特异的折点，基于 24 h 判读结果，CLSI 修订的折点与 EUCAST 推荐的折点之间具有很好的一致性。表 134-1 列出了 CLSI 修订前、CLSI 修订后的 M27-S4 和 EUCAST 的念珠菌对系统性抗真菌药物最新折点[23,25-28,173]。

表 134-1 CLSI(修订前和修订后)和 EUCAST 念珠菌临床折点[a]

药物	CLSI		EUCAST 种特异折点(mg/L)
	M27-S3 非种特异性折点(mg/L)	M27-S4 种特异折点(mg/L)	
两性霉素			≤1
阿尼芬净	≤2	≤0.25；>0.5 (白色念珠菌、克柔念珠菌、热带念珠菌)	≤0.03；>0.03(白色念珠菌)
			≤0.06；>0.06 (光滑念珠菌、克柔念珠菌、热带念珠菌)
		≤0.125；>0.25 (光滑念珠菌)	
		≤2；>4 (近平滑念珠菌)	≤0.002；4(近平滑念珠菌)[b]
卡泊芬净	≤2		—[c]
米卡芬净	≤2	≤0.25；>0.5(白色念珠菌、克柔念珠菌、热带念珠菌)	≤0.016；>0.03 (白色念珠菌)
		≤0.06；>0.125(光滑念珠菌)	≤0.03；>0.03 (光滑念珠菌)
		≤2；>4(近平滑念珠菌)	≤0.002；2 (近平滑念珠菌)[b]
氟康唑	≤8；>32	≤2；>4 (白色念珠菌、近平滑念珠菌、热带念珠菌)	≤2；>4 (白色念珠菌、近平滑念珠菌、热带念珠菌)
		SDD：≤32；>32 (光滑念珠菌)[d]	≤0.02；32 (光滑念珠菌)[b]
伊曲康唑	≤0.125；>0.5		—
泊沙康唑	—	—	≤0.06；>0.06 (白色念珠菌、近平滑念珠菌、热带念珠菌)
伏立康唑	≤1；>2	≤0.125；>0.5 (白色念珠菌、近平滑念珠菌、热带念珠菌)	≤0.125；>0.125(白色念珠菌、近平滑念珠菌、热带念珠菌)
		≤0.5；>1 (克柔念珠菌)	

注：[a]折点显示为 S≤X，R>Y(除了光滑念珠菌修订后的氟康唑折点)，"I"分类(如果存在)简单解释为在 S 和 R 折点之间的值，数据来自文献[25-28][80][82]。[b] EUCAST 将整个近平滑念珠菌野生群归类为对阿尼芬净和米卡芬净"I"，同样，将光滑念珠菌野生群划分为对氟康唑 "I"。这是为了满足这些药物在一些临床病例中的使用。[c] 由于不同实验室间、不同时间点及使用不同批号的纯卡泊芬净药物得到不可接受的 MIC 范围变异，因此，EUCAST 未建立卡泊芬净折点。尽管如此，有确实证据显示阿尼芬净和卡泊芬净之间存在交叉耐药，在卡泊芬净药物特异的 EUCAST 折点建立之前，EUCAST 建议对阿尼芬净敏感的菌株可认为对卡泊芬净敏感。[d] 为了满足在一些临床病例中使用高剂量氟康唑的要求，CLSI 将光滑念珠菌野生群划分为对氟康唑剂量依赖性敏感(SDD)

(二)试验基本原理

1. 最低抑菌浓度 敏感性试验是测量一种药物体外抑制一种微生物生长的效力，MIC 是指抑制菌的生长至预定程度的最低药物浓度。检测生长抑制的方法可选用微量肉汤法或固体琼脂法，即通过将药物混入琼脂中，或将药物注入纸片或纸条中再贴于预先接种菌液的琼脂平板表面。含有药物的固体琼脂法特别适用于高通量试验，常用于环境菌株监测筛选。包含 3 种不同抗菌药物

折点浓度及不含药物阴性对照的商业化四孔平板已通过验证(VIPCheck,奈梅亨,荷兰)[29](图 134-1)。然而,许多技术因素可严重影响体外敏感性试验,包括接种量和接种物制备、培养基配方和 pH、孵育时间、温度及 MIC 终点判读标准等,当建立和解释试验方法时,需要考虑以上所有因素[30-34]。此外,抗真菌敏感性试验还存在真菌所特有的复杂问题,例如,生长速率慢(相对于细菌而言),同种真菌不同形式(双相真菌)的生长能力不同,双相真菌可作为产生分生孢子的单细胞酵母相生长,或作为产分生孢子或孢囊孢子的丝状真菌相生长。最后,还需要考虑抗菌药物自身的基本特性,例如,溶解度、化学稳定性、作用方式和在 MIC 之上广泛浓度范围内产生部分生长抑制的倾向(拖尾现象)。

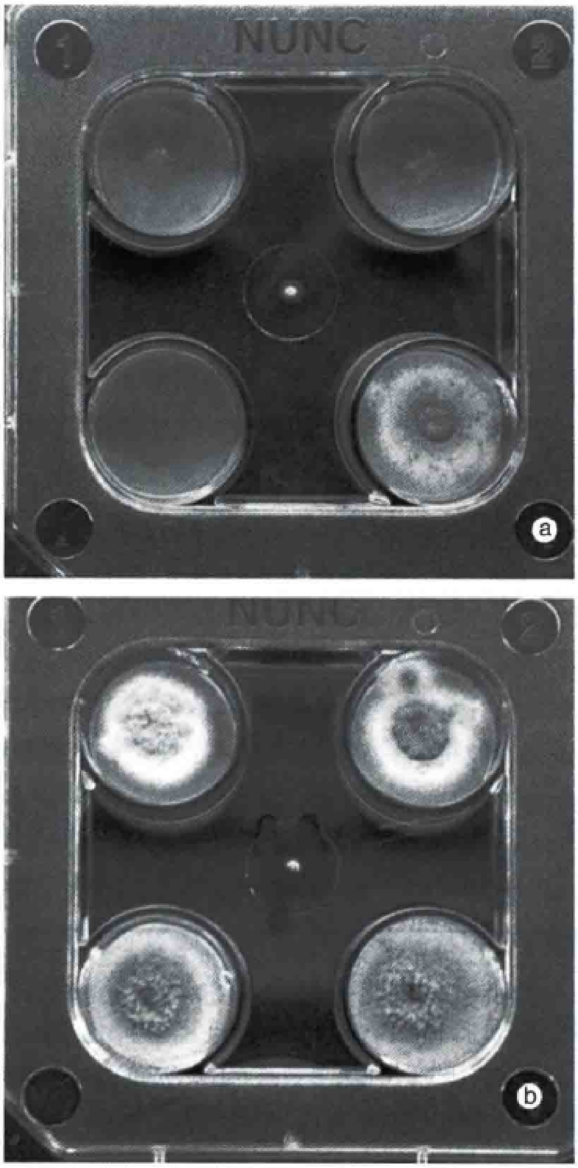


图 134-1 唑类琼脂筛选平板。4 个孔含伊曲康唑 4 mg/L(ITR)(左上孔),伏立康唑 1 mg/L(VRC)(右上孔),泊沙康唑 0.5 mg/L(PSC)(左下孔),或无抗菌药物成分(对照)(右下孔)。上面琼脂平板(a)接种对唑类敏感的烟曲霉野生菌株,而下面琼脂平板(b)接种多重唑类耐药的烟曲霉菌株(平板已孵育 2 天),见彩插

2. 最低杀真菌/致死浓度 许多侵袭性真菌感染患者存在免疫功能缺陷,因此无法产生有效的免疫应答。因为抑真菌药物需要依赖某些宿主吞噬细胞杀灭剩余活的致病真菌,所以可认为在体内能达到有效浓度的杀真菌药物比抑真菌药物能获得更好的治疗效果。有报道显示,棘白菌素类药物(杀真菌药)治疗白色念珠菌引起的侵袭性念珠菌病疗效显著优于氟康唑(抑真菌药),尽管白色念珠菌对两者都敏感[35-36]。目前,尚无用于评估抗菌药物的杀真菌活性的标准实验参数。最低杀真菌浓度(MFC)需要从显示完全抑制生长的每个 MIC 管或孔中取固定量混悬液转种于琼脂培养基上再行测定。不同出版物 MFC 检测的标准不同,MFC 被描述为致使真菌不生长或 3～5 个菌落生长的最低药物浓度。MFC 检测的临床相关性和标准指南的制订仍然是需要解决的问题[37-38]。

(三)临床耐药性和临床折点制定

1. 野生型分布 对于任何微生物群的菌株,采用既定方法检测任何药物,其 MIC 结果分布通常是单态、双态或偶尔显示完全随机分布。通常情况下,对 MIC 随机分布的菌种复合群进一步分类研究,将进一步描述在复合群内的分类组,每个分类组显示不同的敏感谱,例如,在尖端赛多孢(*S. apiospermum*)复合群中的橙黄赛多孢(*Scedosporium aurantiacum*)[39]和在烟曲霉复合群中的迟缓曲霉(*Aspergillus lentulus*)[40]。对于部分真菌,大多数菌株的 MIC 集中在一小部分倍比稀释度内,并且用已定义规则预测不敏感的离群值。一个菌群的敏感性特征可以通过定义 MIC 值范围和计算 50%(MIC_{50})和 90%(MIC_{90})菌株被抑制的值描述。无论如何,当构建野生型菌株分布曲线时,应始终意识到,即使是标准化和受控的试验,也会存在固有的可变性。Arendrup 和同事[41]按照 EUCAST 敏感性试验方法测试同一株氟康唑 MIC 为 2 mg/L 的光滑念珠菌,共测 45 次,发现 MIC 结果为 2～8 mg/L 横跨 3 个 2 倍稀释范围,这一现象在检测到 35 次时就

已十分明显。据推测野生型菌群内的变异，可单独解释为允许每次一个倍比稀释的试验变异。因此，在 1 个正态分布中，MIC_{50} 反映整个野生型菌群的敏感性，并且是一个有用的预测菌种敏感性的指标。

2. 微生物耐药性和流行病学临界值(ECOFF/ECV) 在缺乏可解释临床结果数据预测临床折点时，野生型分布能被用于定义 ECOFF/ECV，这提供了给定的药物-微生物组合遇到的正常敏感性模式的一个指示，并因此确认一个给定的分离菌株是否符合预测的野生型敏感谱，或是显示一个不敏感或非野生型表型。MIC 大于 ECOFF/ECV，不能用固有的实验变异解释，常发现这样的离群值菌株大部分可能隐含耐药机制[42]。因此，临床折点的设定不能高于 ECOFF/ECV，除非有足够的临床证据证明这样的菌株对标准治疗有效[43]。在某些情况下，对于给定的药物，为了获得良好的结果，临床折点可以反映对于给定药物为了获得良好疗效而高于正常血药浓度的需求。对这样的菌株，CLSI 已经使用了"剂量依赖性敏感"(SDD)的术语。该分类已经应用于有明确的临床证据表明可使用更高剂量的伊曲康唑和氟康唑，有明确临床证据表明，对于 MIC 高于正常敏感范围的菌株，使用更高的剂量，进而达到更高的血药浓度，可以影响患者的预后情况。因此，更高的血药浓度能影响 MIC 在通常敏感范围之上分离菌株的结果[44]。当缺乏这样的临床支持性证据时，对于 MIC 结果恰好超过正常野生型菌株的 MIC_{50} 的菌株，可以将其描述为具有中介敏感性，其真正的含义是，当前获得的数据不允许将菌株归类为完全敏感或耐药。EUCAST 没有采用 SDD 分类而是采用了略有不同的其他术语，与药敏试验中使用的 S、I 和 R 分类一致。"I"类别是指菌株/菌种在某些条件下(例如，在靶位高药物浓度)可能对治疗有效，以便适应在某些临床情况下使用抗菌药物的需求。在制定折点时另一个需要考虑的重点是，折点不能划分重要目标物种的野生型分布[41]，引入种特异折点是为了防止这种情况发生，而避免错误分组，并认识到不同物种的毒力是不同的。表 134-1 比较了 CLSI 和 EUCAST 发布的酵母菌种特异折点。

3. 临床折点和临床转归相关的决定因素 设定折点时需要考虑以下参数：①标准剂量；②种特异 MIC 分布；③ ECOFFs/ECVs；④药动学和药效学分析；⑤临床经验和 MIC 结果之间的关系。在理想状态下，所有这些数据都可以得到。然而，设定折点经常是基于并不完美的数据库，通常包括 MIC 分布、某些药动学和药效学信息，以及临床经验，这些数据源自包含野生型菌株引起的感染病例。因此，折点设定并不是一门精确科学，根据临床折点将菌株分类成 S、I 和 R，其本身不能预测治疗结果，因为其他因素都可影响治疗结果，包括感染的严重程度、基础疾病、治疗时机及菌株的毒力等。然而，敏感性分类可以预测一个治疗成功结果的可能性，人们已经提出，对于念珠菌感染的抗真菌治疗应该应用"90-60 规则"，这表明对于由敏感菌株引起的感染，90%的病例治疗有效，而由耐药菌株引起的感染，60%的病例治疗有效[45]。对于慢性或侵袭性霉菌感染该规则不一定适用。粒细胞缺乏患者辅助宿主应答的缺失可能对治疗结果具有额外的不利影响。众所周知，无论是否选择抗真菌治疗，静脉导管的移除也将对预后产生积极的影响[35,46-47]。对于全身性治疗，剂量、给药间隔、给药途径，以及其他药物合用的效应会对达到有效的血药浓度水平产生直接影响，并且通常认为要达到治疗成功的结果，血药浓度水平应该超过 MIC 数倍。例如，发现采用氟康唑治疗时，剂量/MIC 比值达到 25(使用 CLSI 48 h 判读结果获得的高 MICs)或达到 100(使用 EUCAST 和 CLSI 24 h 判读结果获得的低 MICs)与治疗成功显著相关，此结果表示支持该建议的折点[26,38,48]。因此目前，人们越来越意识到，监测某些药物血药浓度的水平，对于疾病治疗是一个重要的部分，尤其是唑类的伊曲康唑、泊沙康唑和伏立康唑[49]。

当局部使用抗菌药物时，例如，治疗皮肤和黏膜念珠菌病、耳真菌病和真菌性角膜炎，较高的折点可能是更适用，因为局部药物浓度可能要超过感染微生物的 MIC 许多倍。以真菌性角膜炎局部治疗为例，对于大部分真菌而言，局部用药如 0.15%(1500 mg/L)两性霉素 B、1%(10 000 mg/L)那他霉素、1%(10 000 mg/L)伏立康唑和 2%(20 000 mg/L)益康唑的浓度会大大超过体外敏感临界值。尽管局部的药物浓度高，但还有其他复杂的和需要考虑的问题，例如，组织渗透性和药物接触时间等，迄今为止，局部治疗的折点设定还没有正式解决。

二、酵母菌标准化肉汤稀释法

目前，有2种国际认可的肉汤稀释法用于检测酵母菌(如念珠菌属)。其中，微量肉汤稀释法(表134-2)已成为抗真菌药物敏感性试验最广泛使用的参考方法。此方法在M27-A3文件[15]和EUCAST E. Def 7.3文件[17]中均有描述，在下文也有概述。

表134-2 CLSI M27-A3文件和EUCAST E. Def 7.2肉汤微量稀释法酵母菌抗菌药物敏感性试验指南*

参数	CLSI M27-A3改良微量稀释法	EUCAST E. Def 7.2
试验菌株	酵母菌	酵母菌
肉汤培养基	用MOPS缓冲剂(0.165 M)缓冲，并含0.2%葡萄糖的RPMI 1640肉汤，pH 7.0，25℃	用MOPS缓冲剂(0.165 M)缓冲，并含2.0%葡萄糖的RPMI 1640肉汤，pH 7.0，25℃
微量稀释板	无菌塑料、每孔可容纳300 μl、一次性使用的96孔圆底平板	无菌塑料、每孔可容纳300 μl、一次性使用的96孔平底平板
改良培养基	①含MOPS的酵母氮基础肉汤(pH 7.0)为新型隐球菌提供更好的生长环境；②含2.0%葡萄糖的RPMI 1640	像其他酵母菌一样检测隐球菌，如果光密度值高于0.2时判读；如果没有，重复试验，但在30℃孵育
药物稀释	培养基添加2×2倍药物稀释液[氟康唑和氟胞嘧啶(5-FC)]，或100×溶剂(两性霉素B、其他唑类、阿尼芬净、卡泊芬净和米卡芬净)	根据ISO推荐规范准备
药物稀释范围		
5-FC和氟康唑	0.12～64 mg/L	0.12～64 mg/L
其他唑类	0.03～16 mg/L	0.015～8 mg/L
两性霉素B和棘白菌素	0.03～16 mg/L	0.03～16 mg/L
制备好平板的存储	密封在塑料袋里，在-70℃或更低可储存长达6个月	密封在塑料袋或铝箔里，在-70℃或更低储存可长达6个月，或-20℃储存不超过1个月
接种物的制备	从沙氏葡萄糖琼脂或马铃薯葡萄糖琼脂板上挑取培养24 h(酵母菌)或48 h(新型隐球菌)的菌落5个	取5个培养18～24 h的菌落(>1 mm)，悬浮于5 ml的无菌蒸馏水中
备用接种物悬液	通过添加无菌蒸馏水，用分光光度计在530 nm处调整相当于0.5麦氏标准浊度[$(1\sim5)\times10^6$ CFU/ml]	通过添加无菌蒸馏水，用分光光度计在530 nm处调整相当于0.5麦氏标准浊度[$(1\sim5)\times10^6$ CFU/ml]
试验接种物	漩涡混合备用接种物15 s，然后用培养基1∶1000稀释(先1∶20，随后1∶50稀释)备用接种物悬液	无菌蒸馏水1∶10稀释备用接种物悬液
接种平板	100 μl稀释过的试验接种物加100 μl 2×药物浓度溶液；最终溶度为$(0.5\sim2.5)\times10^3$ CFU/ml	100 μl稀释过的试验接种物加2×药物浓度溶液；最终溶度为$(0.5\sim2.5)\times10^5$ CFU/ml
生长对照组(s)	100 μl稀释过的接种物加100 μl不含药物的培养基(或加2%的溶剂)	100 μl稀释过的接种物加100 μl不含药物的培养基(或加2%的溶剂)
无菌对照	平板纵列12孔用于无菌对照(仅用不含药物培养基，无接种物)	平板纵列12孔用于无菌对照(仅用不含药物培养基，无接种物+100 μl用于制备接种物的无菌蒸馏水)
QC菌株	选择的QC菌株，其MICs应落在所有测试药物中间范围附近。根据试验频率已经建立了QC试验规则	至少2种QC菌株，其结果接近中间范围
孵育	在35℃孵育	无须振荡，大气环境，(35±2)℃

（续 表）

参数	CLSI M27-A3 改良微量稀释法	EUCAST E. Def 7.2
判读时间	两性霉素 B，24 h 或 48 h；氟康唑，24 h 或 48 h；棘白菌素，24 h；5-FC 和其他唑类，48 h	所有药物(24±2)h，隐球菌 48 h，如果平板的吸光度≤0.2 表明生长不良，再孵育 12～24 h。超过这个时间吸光度没有达到 0.2 说明试验失败。对于隐球菌，30℃重复试验
MIC 测定	借助阅读镜肉眼评估	在 530 nm 处测量分光光度值(或 405 nm 或 450 nm)，其他孔的判读值应该减去无接种物对照的值
两性霉素 B	抑制任何可见生长的最低药物浓度(100% 抑制)	与无药对照相比≥90% 抑制
5-氟胞嘧啶，唑类，卡泊芬净和其他棘白菌素	浊度显著减少(约 50%)的最低药物浓度	与无药对照相比≥50% 抑制
判读修改[b]	孵育 48 h 后用分光光度计在 492 nm 处测定新型隐球菌 MIC 值	

注：[a]数据来自参考文献[15]和[17]；[b] M27-A3 文件包含这种判读修正，使用 10^4 CFU/ml 接种物和酵母氮基础肉汤的微量肉汤稀释法进行检测

(一)标准培养基

推荐用于 2 种参考方法的试验培养基是 Roswell Park Memorial Institute(RPMI)1640 肉汤培养基，该培养基中含有 L-谷氨酰胺和 pH 指示剂，不含有碳酸氢钠(04-525Y 来自 BioWhittaker 公司，Walkersvile，马里兰州和美国 Biorganics 公司，尼亚加拉大瀑布，纽约州；R-6504 来自 Sigma 化学有限公司，圣路易斯，密苏里州)。在 25℃环境下，用吗啉丙磺酸缓冲液(MOPS；pH 7.0，最终摩尔浓度为 0.165)调培养基 pH 至 7.0。该培养基适用于检测大部分真菌[15-16]，但它可能不足以支持新型隐球菌某些菌株的生长或不能测定两性霉素 B 的 MIC 值[50]。含有 2%葡萄糖[67-68]的较高浓度 RPMI 培养基是在 EUCAST 试验中使用的基础培养基，由于它允许酵母菌快速生长，从而有利于在 24 h 测定 MIC[17]。为了简化终点测定，在 CLSI M27-S4 中将最终的葡萄糖浓度修改为 20g/L[25]。

(二)药物储备液

抗菌药物粉末可以直接从药品制造商或信誉好的供应商处获得，但不应使用临床上的静脉注射液或口服制剂。抗菌药物储备液的配制浓度，应至少为待测最高浓度的 10 倍(例如，1280mg/L 的氟康唑和氟胞嘧啶)，水溶性标准粉剂可用蒸馏水制备。检测非水溶性药物时，称足量的标准药物来制备 100 倍于最高检测浓度的储备液。对所有非水溶性药物，EUCAST 和 CLSI 方法学指定用二甲亚砜(DMSO)溶解，如此制备的药敏板可以稳定保存最长 6 个月[51]。称量的实际量必须根据每个标准药物的具体生物学活性进行调整。两性霉素 B 溶液必须避光，用溶剂制备的药物储备液，在使用之前必须静置 30 min。

无菌储备液应该少量分装储存于密闭无菌的聚丙烯或聚乙烯小瓶中，理想情况下应置于－70℃或更低，但一定不能高于－20℃，卡泊芬净在－80℃能存放 3～6 个月而活性不会明显丢失，当需要时取出分装储备液并在当日使用。使用表 134-3 列出的质量控制(QC)菌株来强制评价药物的活性[15,17]。

(三)接种物的制备

接种物应通过表 134-2 列出的分光光度法制备[52]。理想的情况是从培养 24 h 的酵母菌或 48 h 新型隐球菌的培养物挑取 5 个直径均不小于 1 mm 的菌落制备接种物悬液，然后按照 EUCAST 方法，将菌落混悬于 5 ml 无菌 0.85%氯化钠或无菌蒸馏水中，并在漩涡器上剧烈震荡，在 530 nm 处测量细胞悬液浊度，并用适当的悬浮介质调节细胞悬液浊度，与标准 0.5 麦氏硫酸钡产生的透光率相当。这种方法制备的细胞悬液浓度为$(1\sim5)\times10^6$CFU/ml。对于 CLSI 方法，用 RPMI 培养基 1∶1000 稀释，制成 2× 试验接种物[$(1\sim5)\times10^3$ CFU/ml)]。接种于微孔板时，将 2×试验接种物按 1∶1 稀释，获得期望的最终接种

物浓度[(0.5～2.5)×10³ CFU/ml]。而对于EUCAST方法,使用较高的最终接种物,用无菌蒸馏水1∶10稀释标准悬浮液,制成工作悬液(1～5)×10⁵ CFU/ml。

表 134-3 CLSI 与 EUCAST 微量肉汤稀释法常用 QC 和参考菌株 MIC 范围[a]

QC 或参考菌株	抗真菌药物	MIC 范围(mg/L)		
		EUCAST E. def 7.2 和 9.1	CLSI M27-A3 和 M38-A2 24 h,微量稀释	CLSI M27-A3 和 M38-A2 48 h,微量稀释
QC 菌株				
近平滑念珠菌 ATCC22019	两性霉素 B	0.12～1.00	0.25～2.00	0.5～4.0
	阿尼芬净	0.25～1.00	0.25～2.00	0.5～2.0
	卡泊芬净	NA	0.25～1.00	0.5～4.0
	氟胞嘧啶(5-FC)	0.12～0.50	0.06～0.25	0.12～0.50
	氟康唑	0.5～2.0	0.5～4.0	1～4
	伊曲康唑	0.03～0.12	0.06～0.50	0.06～0.50
	酮康唑	NA	0.03～0.25	0.06～0.50
	米卡芬净	NA	0.5～2.0	0.5～4.0
	泊沙康唑	0.015～0.060	0.03～0.25	0.03～0.25
	伏立康唑	0.015～0.060	0.016～0.120	0.03～0.25
克柔念珠菌 ATCC6258	两性霉素 B	0.12～1.00	0.5～2.0	1～4
	阿尼芬净	≤0.06	0.03～0.12	0.03～0.12
	卡泊芬净	NA	0.12～1.00[b]	0.25～1.00[b]
	氟胞嘧啶(5-FC)	1～4	4～16	8～32
	氟康唑	16～64	8～64	16～128
	伊曲康唑	0.03～0.12	0.12～1.00	0.25～1.00
	米卡芬净	NA	0.5～2.0	0.12～0.50
	酮康唑	NA	0.12～1.00	0.25～1.00
	泊沙康唑	0.015～0.060	0.06～0.50	0.12～1.00
	伏立康唑	0.03～0.25	0.06～0.50	0.12～1.00
宛氏拟青霉(*Paecilomyces variotti*)ATCC MYA-3630	两性霉素 B	NA	NA	1～4
	阿尼芬净(MEC)	NA	≤0.015	NA
	伊曲康唑	NA	NA	0.06～0.50
	泊沙康唑	NA	NA	0.03～0.25
	伏立康唑	NA	NA	0.015～0.120
参考菌株				
黄曲霉 ATCC204304	两性霉素 B	0.5～2.0	NA	0.5～4.0
	伊曲康唑	0.12～0.50	NA	0.25～0.50
	泊沙康唑	0.12～0.50	NA	0.06～0.50
	拉夫康唑	NA	NA	0.5～4.0
	伏立康唑	0.5～2.0	NA	0.5～4.0
黄曲霉 ATCC MYA-3631	两性霉素 B	NA	NA	1～8
	泊沙康唑	NA	NA	0.12～1.00
	伏立康唑	NA	NA	0.5～2.0
烟曲霉 ATCC MYA-3626	两性霉素 B	NA	NA	0.5～4.0
	阿尼芬净(MEC)	NA	≤0.015	NA
	泊沙康唑	NA	NA	0.25～2.00

（续 表）

QC或参考菌株	抗真菌药物	MIC范围(mg/L)		
		EUCAST E. def 7.2 和 9.1	CLSI M27-A3 和 M38-A2 24 h，微量稀释	CLSI M27-A3 和 M38-A2 48 h，微量稀释
	伏立康唑	NA	NA	0.25～1.0
烟曲霉 ATCC MYA-3627	两性霉素 B	NA	NA	0.5～4.0
	伊曲康唑	NA	NA	＞16
	伏立康唑	NA	NA	0.25～1.0
土曲霉 ATCC MYA-3633	两性霉素 B	NA	NA	2～8
	阿尼芬净(MEC)	NA	≤0.015	NA
	伏立康唑	NA	NA	0.25～1.0
串珠镰刀菌 ATCC MYA-3629	两性霉素 B	NA	NA	2～8
	阿尼芬净(MEC)	NA	≥8.0	NA
	伊曲康唑	NA	NA	＞16
	泊沙康唑	NA	NA	0.5～2.0
	伏立康唑	NA	NA	1～4
茄病镰刀菌 ATCC 3636	阿尼芬净(MIC)	NA	≥8.0	NA
尖端赛多孢 ATCC MYA-3635	两性霉素 B	NA	NA	4～16
	泊沙康唑	NA	NA	1～4
	伏立康唑	NA	NA	0.5～2.0
尖端赛多孢 ATCC MYA-3634	阿尼芬净(MEC)	NA	NA	1～4
须癣毛癣菌	环吡酮	NA	NA	0.5～2.0(4天)
MRL 1957	灰黄霉素	NA	NA	0.12～0.50(4天)
ATCC MYA-4439	伊曲康唑	NA	NA	0.03～0.25(4天)
	泊沙康唑	NA	NA	0.03～0.25(4天)
	特比萘芬	NA	NA	0.002～0.008(4天)
	伏立康唑	NA	NA	0.03～0.25(4天)
红色毛癣菌	环吡酮	NA	NA	0.5～2.0(4天)
MRL 666	氟康唑	NA	NA	0.5～4.0(4天)
ATCC MYA-4438	伏立康唑	NA	NA	0.008～0.060(4天)

注：[a]数据来自 EUCAST E. Def 7.2 和 9.1，以及 M27-S3、M38-A2 和 M27-S4[15-18,80,82]。NA. 不适用。更多菌株的数据可在这些出版物中获得。[b]利用15个参考实验室在2010年产生的数据建立了卡泊芬净和克柔念株菌 ATCC6258 的 QC 范围。从那以后，卡泊芬净敏感试验发生了显著的变化，其原因尚未完全阐明。M27-S4 文件中批准的临床折点是基于使用高效力的卡泊芬净粉剂建立的，卡泊芬净对克柔念珠菌 ATCC6258 的 24h MIC 范围(众数)为 0.06～0.25 mg/L(0.125 mg/L)。尽管 QC 菌株测定结果在上述可接受范围内，但仍会出现错误分类分离株的敏感性情况[80]

(四)药物稀释和酵母菌微量稀释试验

疏水性药物溶解于溶剂而不溶于水(如多烯类、棘白菌素类，一些氟康唑制剂除外的唑类)，用100%DMSO 作为稀释剂，稀释储备溶液制备成中间试验药物稀释液，达到相当于最终药物浓度的100倍(如 3～1600 mg/L)。稀释液应该根据 ISO 推荐规范准备[53]。该过程可以预防低溶解能力的药物在水中沉淀。如果执行稀释过程与参考方法相同，可以使用替代稀释方案[54]。尽管仔细的操作，伊曲康唑和某些其他药物仍不能通过稀释完全溶于水，这使得使用 QC 程序最大限度减少误差显得至关重要。对于水溶性药物，如氟胞嘧啶和某些氟康唑制剂，根据2倍药物稀释方案，直接将储备液加入 RPMI 培养基中，形成10倍的最终试验药物浓度[15][如(1.2～640.0)mg/L 的氟康唑和氟胞嘧啶]。使用 RPMI 培养基分别 1∶5和1∶50 稀释10倍和100倍药物浓度，获得微量稀释法需要的2倍药物浓度。在接种步骤完成后，两性

霉素 B 和三唑类的药物浓度为(0.03～16.00) mg/L,氟康唑和氟胞嘧啶的药物浓度为(0.12～64.00)mg/L。由于棘白菌素在低浓度是有效的,并包含了 EUCAST 折点,对这些药物推荐药物稀释范围为(0.08～4.00)mg/L 或更低。

使用无菌、一次性多孔微量稀释聚苯乙烯板(EUCAST 推荐 96 孔平底型板,CLSI 则推荐 U 型板)进行微量肉汤稀释试验。未处理板或组织/细胞培养板有着不同的结合能力,EUCAST 用于制定临床折点的大部分数据均使用预处理板获得。使用多通道移液器(或 96 孔板分配仪)吸取 100 μl 2×药物浓度溶液,加到微量稀释板 1～10 列孔中。第 1 列孔含有最高药物浓度,第 10 列孔含有最低药物浓度。微量稀释板应密闭在塑料袋中,储存于 −70℃(或 −80℃)可达 6 个月或 −20℃不超过 1 个月[15,17,51]。试验当天向每孔接种 100 μl 2×接种物,达到最终试验浓度(每孔最终体积为 200 μl)。生长对照孔(第 11 列孔)加入 100 μl 无药无菌培养基(水溶性试剂)或 100 μl 含有 2%溶剂的无药无菌培养基(非水溶性试剂)和 100 μl 2×接种物。以与其他菌株相同的方式,检测 QC 酵母菌,即便每次检测一株分离菌,也应包括 QC 酵母菌。微量稀释板第 12 列孔用于无菌对照(仅有无药物培养基)。

(五)孵育和微量稀释法测定酵母菌 MIC

在 35℃大气环境中孵育微量稀释板。对于 EUCAST 方法,推荐孵育 24 h,此时检测孔光密度较背景水平增加≥0.2。对于 CLSI 方法,在大多数情况下,当检测念珠菌时,氟康唑、泊沙康唑、伏立康唑、两性霉素 B 和棘白菌素的结果也可以在 24 h 后评估[15,21-24]。氟康唑、伏立康唑和棘白菌素建议的折点是基于 24 h 的判读结果[25]。

MIC 终点判定是抗菌药物敏感试验关键性的一步,特别是唑类(酵母菌)和棘白菌素类(酵母菌和霉菌)。CLSI 方法是通过肉眼判读终点,而 EUCAST 使用平底板检测,允许用非主观因素分光光度法测定,通过试验孔与相应对照孔达到的光密度固定百分比,来定义 cutoff 值。推荐在 530 nm 处读取板条孔中的吸光度,虽然其他波长也可使用(如 405 nm 或 450 nm),但其他孔的读取值应该扣除空白背景值。对于 CLSI 方法,借助阅读镜(如 Cooke Engineering Co., Alexandria, VA)观察每一试验孔生长情况,与生长对照孔(无药物)进行比较,两性霉素 B 的 MIC 定义为观察到完全没有生长(肉眼观察清晰)的最低浓度;对于 EUCAST 方法,假如用分光光度计判读,则读取 100%抑制或≥90%抑制。

对于抑真菌化合物如唑类,观察到部分抑制或拖尾现象,应避免采用完全没有生长的孔作为终点。此外,如果以生长抑制曲线的最陡峭部分作为终点,就可以获得最高的重复性。因此,对于 CLSI 和 EUCAST 这 2 个标准,唑类、棘白菌素和氟胞嘧啶的 MIC 被定义为观察受试菌株生长受到显著抑制的最低浓度(与生长对照孔相比≥50%抑制)。对于目测判定,强烈建议在测定 MIC 之前震荡微量稀释板,这一步骤有利于对显著的生长抑制进行肉眼评估[55]。

当在 48 h 时判读氟康唑的 MIC 值时,大约有 5%的分离株可观察到终点严重拖尾,但在研究此种分离株在感染动物模型和口咽念珠菌病患者的体内应答时,发现它们对低剂量氟康唑治疗的应答方式与完全敏感株相同[44-56]。

(六)宏量稀释法

宏量肉汤稀释试验适合于所有抗菌药物敏感性试验,并适合于试验量很小的小型实验室。在这里仅详细讨论与宏量稀释试验相关的步骤和试验条件(表 134-2)。用 RPMI 培养基进一步稀释(1∶10)每个中间药物浓度溶液,以获得 10 倍的最终浓度,这一步把溶剂最终浓度减少到 10%。分配 0.1ml 10×药物稀释液到圆形底、卡式帽、无菌的聚苯乙烯试管中(75mm×12mm,如 Falcon 2054; Becton Dickinson Labware, Lincoln Park, NJ),这些试管能在 −60℃或更低温度下储存 3～6 个月。在试验的当天,每管中接种 0.9ml 相应稀释的酵母菌接种物悬浮液。此步使药物稀释至上述最终试验药物浓度,而在每个 MIC 管里相应的溶剂达到 1%。按照上面微量稀释试验所描述方法制备和调整储备接种悬液,然后用 RPMI 培养基 1∶2000 稀释,提供浓度为(0.5～2.5)×10^3CFU/ml 的接种物。生长对照管加入 0.9 ml 接种物悬浮液和 0.1 ml 含 1%相应溶剂的无药培养基。与其他分离株一起,以相同的方式检测 QC 酵母菌,即使每次检测一株分离菌也应包括 QC

菌株。此外，将1 ml未接种菌液的无药培养基(对于水溶性药物)或含1%相应溶剂的无药培养基作为无菌对照。

(七)孵育和酵母菌宏量稀释法MIC测定

将MIC试管置于35℃大气环境中，无振荡孵育24～48 h(念珠菌属)或70～74 h(新型隐球菌)，每支试管的生长或浊度呈肉眼可见的梯度现象。对于两性霉素B，MIC的判读为抑制任何可见生长的最低浓度；而对于唑类和氟胞嘧啶，MIC定义为相对于生长对照孔，浊度出现大约50%显著降低的最低药物浓度(表134-2)[15]。

(八)酵母菌试验的质量控制

MIC试验的QC菌株对于良好的实验室实践至关重要。根据CLSI和EUCAST质控菌株的选择指南，近平滑念珠菌ATCC22019和克柔念珠菌ATCC6258经常被选为QC菌株。然而，当检测卡泊芬净时，EUCAST指南警告使用这些作为QC菌株，由于它们在检测卡泊芬净效力的变化不够敏感，因此，对此药物首选白色念珠菌ATCC64548或ATCC64550作为QC菌株[17,51]。表134-3总结了这些QC菌株对10种抗菌药物预期的MIC范围[15,25]。对新购的每一批次的培养基、宏量稀释管和微量稀释板，应用2株QC菌株中之一种进行检查，测定MIC是否在范围内。此外，应该通过每天检测1株或2株QC菌株对每个药物的敏感性试验，全面监控检测系统的性能。当QC菌株的MIC值不在预期范围内，应采取纠正措施，有关详细的纠正措施参见M27-A3[15]和EUCAST 7.3文件[17]。精选的可能有用的参考菌株保存于美国标准菌库(ATCC)(表134-3)。

三、除念珠菌外的酵母菌

虽然CLSI和EUCAST方法只提供了最常见的人类致病念珠菌的建议折点(表134-1)，值得注意的是，该方法广泛适用于大多数发酵酵母菌。然而，对非发酵酵母菌如隐球菌、马拉色菌、毕赤酵母菌、解脂耶氏酵母菌、地丝菌、红酵母菌、掷孢酵母菌和毛孢子菌，还存在一些问题。此外，上述方法尚未在地方性双向真菌的酵母相中进行验证。CLSI[15]和EUCAST方法[17]包含有隐球菌的检测。由于它们比念珠菌生长得慢，建议孵育72 h[15]，或使用EUCAST的方法，当光密度超过0.2就可以判读，如果没有达到这个值，建议在30 ℃预孵育平板重做试验。另外，CLSI M27-S4[25]建议使用酵母氮基础葡萄糖(YNBG)肉汤，可以促进新型隐球菌的生长，从而有利于MIC值的测定。最近的一项研究对检测一系列非发酵酵母菌的药敏试验多个不同参数进行了调查，这些参数包含生长培养基(RPMI与YNBG)、0.2或2.0%的葡萄糖、震摇或静止、不同的氮源、孵育温度(30℃与35℃)和接种量(10^3、10^4、10^5 CFU/ml)。研究得出结论，使用YNBG培养基、震摇、较低的孵育温度，能提高受试的隐球菌和大部分其他非发酵酵母菌的生长率。上述条件允许在24 h后判读，测定的终点更有一致性，然而，通过不同的方法获得的MIC没有显著差异[50]。两项大型的全球性研究，使用CLSI M27-A3的方法，在RPMI培养基中，72 h判读结果，定义氟康唑、伊曲康唑、泊沙康唑和伏立康唑的ECVs[57-58]。其中最大的一项研究[58]报道了超过3000株新型隐球菌和大于700株格特隐球菌的敏感性模式。在YNBG培养基中检测更小部分的菌株，氟康唑众数MIC高于以前[59]所报道的值，这表明使用不同方法得到的敏感性试验结果存在可变性。

大多数马拉色菌不能在RPMI培养基中生长，因为其需要富含脂质的环境，迄今为止，还没有形成一个共识确认马拉色菌的标准试验方法。厚皮马拉色菌(*Malassezia pachydermatis*)能在RPMI培养基中生长，但生长速度比大多数发酵酵母菌慢，尽管文献中已有微量稀释试验和其他试验的报道。然而，依据绝对的MIC值和解释结果两者关系，出现了相互矛盾的结果，所以该菌属还未建立折点。到目前为止，马拉色菌的敏感试验仍处在调查研究阶段，并不推荐在临床应用[60-61]。

四、特殊考虑

(一)两性霉素B

通过微量肉汤稀释法测定两性霉素B MIC，94%临床分离的酵母菌MIC集中在(0.25～1.00)mg/L，通常将≥1.0 mg/L作为该药的折点。敏感和潜在耐药分离株两性霉素B的MIC

通常不超过 1 个稀释倍数，所以解释结果时需谨慎。虽然有证据表明抗生素培养基 3 能提供可靠的耐药菌株检测结果，但有报道培养基批次间存在变异性[62]。此外，这种培养基不能提高对两性霉素 B 治疗失败(微生物学失败)的念珠菌病患者分离的潜在两性霉素 B 耐药株的检出[63]。应用 Etest 方法在体外可能更容易检测到两性霉素 B 的耐药性[64]。因此，需要进一步对该药的方法学进行优化，但因为缺乏具有明确耐药机制的菌株，仍面临一些困难。

(二)卡泊芬净

近来，不断有人质疑通过 CLSI 或 EUCAST 方法进行微量稀释试验检测卡泊芬净的正确性[65-66]。一项来自 17 个实验室的多中心研究数据分析了多达 11 550 株念珠菌，发现对大多数菌株在模态值，以及截断和双峰的分布存在很大差异。尽管检查了许多不同的试验参数，包含卡泊芬净粉剂来源、储存时间和温度、溶剂和 MIC 测定，但不能确定这种变异的任何单一来源[66]。总的来说，3 种棘白菌素对念珠菌的疗效是一致的，即耐药突变赋予 3 种化合物交叉耐药。因此，对阿尼芬净和米卡芬净耐药均被算作对卡泊芬净耐药[28,67-68]。然而，研究证明某些 *FKS* 突变的光滑念珠菌有不同的活性，其对阿尼芬净和卡泊芬净耐药，但在体外和动物模型中该菌对米卡芬净不耐药[42]。因此，此时的推荐是使用阿尼芬净作为棘白菌素敏感和耐药的标志，如果发现阿尼芬净耐药，应重测光滑念珠菌对米卡芬净的敏感性[66]。EUCAST 仅提出了阿尼芬净和米卡芬净的解释折点[43,69]。

五、CLSI 和 EUCAST 的念珠菌折点

现在众多数据表明，念珠菌和某些三唑类、两性霉素 B 和棘白菌素根据标准化的抗菌药物敏感性试验提供的结果，其预测的结果符合 90-60 规则[15,17]。根据 CLSI M27-A3 方法检测氟康唑、伏立康唑、阿尼芬净、卡泊芬净和米卡芬净对分离菌株的 MIC 值，以及从口咽念珠菌病患者、非中性粒细胞缺乏的念珠菌血症患者和某些侵袭性感染患者中提取菌株的临床相关资料，同时也考虑到流行病学临界值，最终建立了 MIC 解释折点(表 134-1)[25,70-71]。通过 EUCAST E. Def 7.3 方法检测酵母菌建立的折点适用于两性霉素 B、氟康唑、泊沙康唑、伏立康唑、阿尼芬净和米卡芬净[19,43,69,72-77]。出于 2 个非常相似的药敏方法获得的结果应采用不同的折点标准来解释的考虑，在 CLSI 和 EUCAST 酵母菌折点不一致的合理化方面进行了大量工作[23-24,26-27,78-80]。自 CLSI M27-A3 出版以来，上述观点尤其正确。与 EUCAST E. Def 7.3 相似，CLSI M27-A3 允许在 24 h 判读结果，以至大多数药物-微生物复合物形成较低的 CLSI MIC 值(24 h 判读也表明有较低的 QC 范围)[15]。目前，CLSI 折点的更改已经作为 M27-S4 文件[25]参考方法的一个补充内容出版，并在 M80 文件中进行了些许修订[174]，而这些更改与 EUCAST 折点一起列在表 134-1 中。首次有了种特异折点后，准确的菌种鉴定成为折点解释的一个重要组成部分。几乎所有药物-微生物复合体已经实现协调统一，其中，依然存在的分歧主要是取决于两种方法读取终点的差异(如阿尼芬净)。

氟康唑在≤2 mg/L 的浓度可以抑制大多数(约 90%)的念珠菌，所以 2 mg/L 是大多数菌种的敏感性折点，4.0 mg/L 判定为 SDD(CLSI 分类)或 I(EUCAST 分类)，≥8 mg/L 则判定为耐药。氟康唑剂量为 800 mg/d 时血药浓度峰值达到 40～60 mg/L，菌株对氟康唑为 SDD，而低剂量时血药浓度峰浓度≤30 mg/L。预测氟康唑疗效的药效学参数约为 100[浓度-时间曲线下的面积(AUC)/MIC 比率]。光滑念珠菌、克柔念珠菌及耳念珠菌的氟康唑 MIC 值通常高于其他菌种，分别在 4～16 mg/L、16～64 mg/L、8～64 mg/L 时[11,81]。这些菌种不是氟康唑的最佳试验对象，但因为光滑念珠菌对氟康唑不完全耐药，光滑念珠菌野生菌群被归类为 SSD/I，以便适应在某些临床情况下使用这些化合物的需求[17,25,44]。相反，克柔念珠菌和耳念珠菌被认为对氟康唑固有耐药，不可用氟康唑进行治疗[11,25]。

EUCAST 建立了白色念珠菌、近平滑念珠菌和热带念珠菌的种特异性伊曲康唑临床折点[72]，CLSI M27-S4 或 M60 尚未颁布伊曲康唑种特异性折点，但是伊曲康唑非种特异性折点在 CLSI M27-S3 文件中有提到[82]。除光滑念珠菌(0.06～8.00 mg/L)和克柔念珠菌(0.5～2.0 mg/L)外，伊曲康唑 MIC 在 0.01～1.00 mg/L 或

更低，对大部分酵母菌通常有很好的体外活性。总的来说，≥99%的念珠菌可以被≤1 mg/L 伊曲康唑抑制，所以这个浓度是 CLSI 推荐的耐药性折点[83]。MIC≤0.125 mg/L 的菌株被考虑为敏感，而 MIC 为 0.5 mg/L 被列为 SDD。对于伊曲康唑，在 SDD 范围内的 MIC 表明为了达到最佳应答需要更高的血清浓度。人们已逐渐认识到需要建立种特异性折点，最近已发布了种特异性 CLSI ECVs，它可以辅助检测和监控任何获得性耐药的发展[70]。

对大部分念珠菌，CLSI 和 EUCAST 文件对伏立康唑的敏感折点为≤0.12 mg/L 达成一致性共识。但是 CLSI 文件指定 SDD 为 0.5mg/L 和耐药折点为≥1.0 mg/L（表 134-1），EUCAST 将分离菌株伏立康唑 MIC>0.12 mg/L 分类为耐药。伏立康唑 MIC≥1.0 mg/L（CLSI 耐药终点）分离菌株大部分是光滑念珠菌，此菌没有可接受的折点，但也包括非念珠菌属如赭色掷孢酵母菌（*Sporobolomyces salmonicolor*）、深红酵母菌（*Rhodotorula rubra*）和一些白色念珠菌[81]。药动学和药效学参数表明，24 h 游离-药物 AUC/MIC 比率为 24 和 75～100，分别预测 50%的有效剂量和 2-log CFU 的减少。推荐剂量将产生约 20 μg · h/ml 游离-药物 AUCs[84]。然而，伏立康唑具有非线性和可变的药动学，估计 AUC 的变异系数为 74%～100%。蒙特卡洛（Monte Carlo）模拟实验表明，将游离-药物 AUC/MIC 比率等于 24 作为一个特定值，如果通过静脉给药治疗，将抑制 99%的 MIC≤0.5 mg/L 的菌株，如果通过口服给药，将抑制 99%的 MIC≤0.25 mg/L 的菌株[75]。

基于对已知的野生型分布及药动学参数的再次详细评估，EUCAST 也完善了泊沙康唑对于念珠菌的折点，并建议敏感折点≤0.06 mg/L 和耐药折点>0.12 mg/L[74]。最近多个实验室共同分析 8 种念珠菌对氟康唑、泊沙康唑和伏立康唑的 ECVs，结果表明如果通过 CLSI 方法评估，则折点应该更高[85]。

通过对累积数据分析，重新评估了棘白菌素 CLSI 临床折点，结果表明先前的 CLSI 将棘白菌素对大多数念珠菌 MIC 值定义为≤2.0 μg/ml 敏感和≥2.0 μg/ml 为非敏感的折点阈值太高，这导致了相当数量的用棘白菌素难以治疗的菌株和已知 *FKS* 突变的感染菌株误分类为敏感，而 *FKS* 突变被认为是菌株对棘白菌素耐药的一个标志[79]。因此，除了近平滑念珠菌和季也蒙念珠菌，对棘白菌素药敏试验建议使用较低药物浓度和种特异的流行病学临界值（表 134-1）。CLSI 念珠菌折点在 3 种棘白菌素之间是不同的，光滑念珠菌比其他大多数念珠菌折点低。2001－2009 年 Pfaller 及其同事[28]从全球 100 个研究中心收集的 15 269 株念珠菌，应用这些新的折点，检出相当数量非野生型耐药模式菌株，而应用旧的较高的临床折点可能会漏检非野生型耐药株。目前，由于体外检测卡泊芬净结果变异显著，EUCAST 没有设置该药的折点[66]。由于 EUCAST 方法提供的 MIC 比 CLSI 获得的值低，所以 EUCAST 阿尼芬净和米卡芬净的折点是低于 CLSI 提出的对应折点。因此，对于这 2 种方法，折点基本上反映 ECOFFs/ECVs，差异取决于方法。在解决卡泊芬净试验重复性问题和建立折点之前，阿尼芬净被认为是卡泊芬净敏感性一个很好的标志物[68]。然而，对于米卡芬净和光滑念珠菌，由于某些较弱的突变提升阿尼芬净和卡泊芬净的 MIC，但不提升米卡芬净的 MIC，并已经证明其活性差异与在动物模型中疗效损失无关[42]，因此，阿尼芬净是首选检测卡泊芬净和阿尼芬净敏感性的药物。与 CLSI 不同的是，EUCAST 将棘白菌素类野生型近平滑念珠菌归类为 I，认为较高的棘白菌素类 MIC 与靶基因固有改变相关，而且对于近平滑念珠菌，棘白菌素类并未表现出较氟康唑的优势，这一情况与其他菌种不同。但是，近平滑念珠菌及其复合群内部菌种毒力较低，尽管 MIC 较高，仍将棘白菌素类用作该菌一线治疗药物。

建议两性霉素 B 的折点≤1.0 mg/L（敏感）和>1.0 mg/L（耐药）[73]。该折点在过去已经被应用并且大多数出版物支持其应用，但根据既往临床经验很少存在 MIC>1 mg/L 的念珠菌分离株。在 EUCAST 网站上，通过访问 MIC 分布和 ECOFFs（http://www.eucast.org/antifungal_testing_afst）或在 CLSI 文件 M59[174]中，可获得此处未提及的药物-生物体组合的其他 ECOFF 值。

六、酵母菌的替代药敏方法

虽然 CLSI 和 EUCAST 方法对于体外药物敏感性试验的标准化和提高实验室间的重复性至关

重要，但它们可能不是检测所有微生物或所有药物或临床实验室常规使用的最佳方法。参考方法一旦确立，就产生了能够得出与参考方法结果相似的商业方法。最常用于抗真菌药敏试验的方法见表 134-4。

表 134-4 抗菌药物敏感性试验使用的方法[a]

试验方法	终点判定方式
宏量肉汤稀释法（酵母菌）	与生长对照管肉眼比较浊度（≥50%抑制）（M27-A3 文件）
微量肉汤稀释法（酵母菌）	与生长对照管肉眼比较浊度（≥50%抑制）（M27-A3 文件）
微量稀释比色法[酵母菌（YeastOne）和霉菌]	肉眼观察颜色变化
微量稀释分光光度法（酵母菌）	用分光光度计进行比浊法测定 MIC（EUCAST E. Def 7.2）
宏量和微量稀释法（丝状真菌）	与生长对照管肉眼比较生长[50% 抑制或更多（非皮肤癣菌）或 80% 或更多（皮肤癣菌）或 MEC]（M38-A2 文件，EUCAST E. Def 9.1）
宏量琼脂稀释法（酵母菌和霉菌，标准平皿）	肉眼
琼脂扩散法（酵母菌和霉菌）	抑菌环直径（肉眼）
纸片法（酵母菌和霉菌）	抑菌环直径（肉眼）（CLSI M44-A2，M51-A1）
抗菌药物梯度试纸条（如，Etest）（酵母菌和霉菌）	椭圆形抑制（肉眼）

注：[a]数据来源于参考文献[15-20]

（一）比色法

比色指示剂或荧光染料可以帮助确定 MIC 终点。适合抗菌药物敏感试验既有商业（Sensititre YeastOne，ASTY 和 Fungitest）也有非商业（四氮唑盐方法和底物吸收指示剂）的规程[86-89]。Sensititre YeastOne YO2IVD 板（TREK Diagnostic Systems，Inc.，Cleveland，OH）遵循 CLSI 参考方法相同的微量稀释法格式，并且已经被美国 FDA 批准和取得 CE 认证，用于检测非苛养酵母菌对氟康唑、伊曲康唑、伏立康唑、氟胞嘧啶和卡泊芬净的敏感性，在同一检测板上包括 1 株 QC 菌株。在美国，Sensititre YeastOne Y09 板中包括其他系统性抗菌药物，如两性霉素 B、泊沙康唑、阿尼芬净和米卡芬净，可用于非诊断用途，而已经取得 CE 认证的 Sensititre YeastOne Y10 中具有相同范围的抗菌药物已在欧洲使用。通过内含的氧化还原比色指示剂 Alamar 蓝可增强对终点的判读。如检测孔保持蓝色，则提示没有生长，粉色小孔提示有生长，而紫色小孔提示部分抑制。对于泊沙康唑和伏立康唑（95.4%），以及阿尼芬净、卡泊芬净和米卡芬净（100%），其与参考方法微量肉汤稀释法 MIC 值在 2 个倍比稀释度内，具有极好的一致性，所有结果在孵育 24 h 后判读[87,89]。最近对棘白菌素与 404 株白色念珠菌，使用新的临床折点和流行病学临界值，评价了 Sensititre YeastOne 和 CLSI 微量肉汤稀释法，表现出极好的一致性，并与分类值相吻合。对于白色念珠菌，分类一致性范围从 93.6%（卡泊芬净）到 99.6%（米卡芬净），极重大或重大错误<1%[90]。对于光滑念珠菌和克柔念珠菌与卡泊芬净，其结果并不理想（分别为 87.9%和 69.1%）。近期有研究将大量已知携带 *FKS* 基因突变的棘白菌素类耐药菌株纳入分析，采用棘白菌素类种特异性 ECVs，针对阿尼芬净、卡波芬净和米卡芬净，分别有 88.9%、91.4%和 93.8% 菌株被准确分类[91]。

（二）Vitek 2 酵母菌敏感性试验

在努力实现自动化酵母菌敏感性试验方面，生物梅里埃（bioMérieux）（Hazelwood，MO）开发了 Vitek 2 酵母菌敏感性试验，这个商业试验系统基于分光光度分析，并将二倍稀释参考方法结合到微型化卡片中。采用该系统对几百株念珠菌进行两性霉素 B、氟胞嘧啶、氟康唑和伏立康唑的药物敏感性检测，其结果表现重复性好、快速、准确，与 CLSI 结果一致性好[92-93]。也有另一研究通过 Vitek 2 系统特异性检测已知耐药机制的 36 株白色念珠菌和 86 株光滑念珠菌对氟康唑和伏立康唑的耐药性，调查 Vitek 2 系统的潜在能力[94]。Vitek 2 系统检测的耐药性表现出与参考的微量肉汤稀释法相当吻合，对氟康唑和伏立康唑总体分类

一致性均达 97.5%。在另一项研究中，Cuenca-Estrella 和他的同事[95]应用 154 株菌，其中包括对唑类和两性霉素 B 耐药的菌株，对 Vitek 2 抗真菌敏感性试验系统与 CLSI 和 EUCAST 肉汤稀释参考法，以及 Sensititre YeastOne 和 Etest 技术进行了比较。对于白色念珠菌在 2 个二倍稀释度内的基本一致性>95%，对于新型隐球菌是 92%，因此他们得出结论，Vitek 2 系统是一个检测酵母菌抗真菌敏感性的可靠技术，而且是一个更快速、简便和可替代参考程序的方法。念珠菌的结果读取平均时间为 15.5 h，隐球菌为 34 h。最近，已将卡泊芬净列入 Vitek 2 测定板。该系统的一个缺陷是，其可报告的 MIC 范围是≤0.25 mg/L 至≥4.00 mg/L，不包括光滑念珠菌修订的折点(S≤0.125 mg/L)，所以不能区分敏感和中介菌株。最近的一项研究评估了 Vitek 2 检测卡泊芬净敏感性的性能，使用一个定义明确的药敏板检测野生型和 5 种最常见的念珠菌耐药突变株。若光滑念珠菌分离株 MIC≤0.25 被认为敏感，没有错误分类的敏感的野生型菌株。然而，有 19.4%(6/31)隐含 *FKS* 热点的耐药突变菌株被错误分类为敏感[76]。用于 Vitek 2 系统的 AST-YS05 药敏卡已经在美国和欧洲上市，包含氟康唑、伏立康唑和卡泊芬净。

(三)流式细胞术

流式细胞术也适合于抗菌药物敏感性试验，通过在培养物中加入可结合 DNA 的活体染色染料，检测暴露抗菌药物后真菌细胞的损伤。用这种方法得到的 MIC 堪比 M27-A3 方法获得的值[77]。尽管这种方法可以更快速获得结果(4～6 h)，但 MIC 测定需要流式细胞仪，这妨碍其在小型实验室的使用。另外，该方法没有获得 FDA 批准和 CE 认证。

(四)酵母菌标准纸片扩散法

在世界范围内，最常用的抗菌药物敏感性试验技术是纸片扩散法，它产生一个定量的结果(抑菌环)，并根据获得的抑菌环大小与已知 MIC 之间的关系，得到一个定性的解释类别(如敏感或者耐药)。琼脂纸片扩散法是一种简单、灵活和成本效益高的方法，可以替代肉汤稀释试验。CLSI 抗菌药物敏感性试验分会已制订一种纸片扩散法(表 134-5)，用于检测念珠菌对卡泊芬净、氟康唑、泊沙康唑和伏立康唑的敏感性，尽管仅有卡泊芬净、氟康唑和伏立康唑的解释标准，但目前还没有 FDA 批准的商品化纸片(CLSI M44-A2 文件)[19]。M44-A2 纸片扩散法一个显著的优点是，在孵育 20～24 h 后就可以得到结果。作为全球调查的一部分，在世界范围内通过纸片扩散法广泛测试氟康唑和伏立康唑，结果表明此方法效果良好[96]。已证明在用于卡泊芬净时也有良好的效果[97]。研究结果也表明，M44 纸片试验方法对检测新型隐球菌和其他酵母菌敏感性，是一种有用的方法[96,98]。已批准抑菌环解释标准的药物有氟康唑、伏立康唑、卡泊芬净和米卡芬净(CLSI M44-S3，现已更新为 M60 文件)[99,173]。

表 134-5　CLSI M44-A2 文件念珠菌抗真菌药物纸片扩散法敏感性试验指南[a]

参数	描述
琼脂培养基	Mueller-Hinton 琼脂+2%葡萄糖和 0.5 μg 亚甲蓝染料/ml
接种物的制备	对微量和宏量肉汤稀释法，如表 134-2 描述从沙氏弱葡萄糖琼脂上取 24 h 培养物
试验培养基	原液接种物悬液，用分光光度计在 530 nm 波长处调整浊度至 0.5 麦氏标准：$(1\sim5)\times10^6$ CFU/ml
纸片含药量	卡泊芬净 5 μg；氟康唑 25 μg；泊沙康唑 5 μg；伏立康唑 1 μg
培养条件	20～24 h，35℃
阅读抑菌环直径	在生长显著减少的点，按最接近整毫米读数，忽略抑菌环边缘针尖样小菌落或抑菌环内大菌落

注：[a]数据来源于 CLSI M44-A2[19]

1. 标准培养基　CLSI M44-A2 方法使用 MH 琼脂添加 2% 葡萄糖和 0.5 mg/L 亚甲蓝，添加葡萄糖可以促进生长，添加亚甲蓝使产生的抑菌环更清晰[19]。在室温下培养基凝固后，其 pH 为 7.2～7.4，并且琼脂表面应是湿润的，但无湿气水滴。可以在制备培养基过程中加入添加剂，或将添加剂加到商品化制备的 MH 琼脂平板上，后者可以使用细菌学实验室的常规琼脂平板。

2. 接种物的准备 M44-A2方法使用的接种物悬液，如上述肉汤稀释标准方法进行制备（表134-2）[15]，通过分光光度计调整浊度达到0.5麦氏标准。

3. 酵母菌的纸片扩散法的操作 将已校正浊度的接种物悬液在15 min内接种在琼脂平板上，如表134-5所示。简单来说，将一支无菌棉签浸入未稀释的接种物悬液，旋转几次，然后在液面上方的内侧管壁上用力挤压，挤出棉签上多余的液体。在整个干燥的琼脂平板表面，从3个不同方向均匀划线，最后步骤用棉签擦抹一下平板边缘。接下来半开着平板盖子使琼脂表面干燥，此过程不应超过15 min。将氟康唑(25 μg)、泊沙康唑(5 μg)、伏立康唑(1 μg)、卡泊芬净(5 μg)和米卡芬净(10 μg)纸片分别贴放在接种过菌悬液的琼脂表面，必须将纸片压实以保证与琼脂完全接触，并均匀分布，相邻各纸片间中心距离不小于24 mm。纸片被放置后就不可移动，因为药物扩散几乎是瞬间发生的。在贴好纸片后15 min内，应将平板放置于培养箱中[19]。

4. 酵母菌纸片扩散法孵育和抑菌环直径测定 在35℃孵育20～24 h后，形成的抑菌环应为均匀的圆形，酵母菌呈融合草坪样生长。用反射光照明，将平板放在一个黑色不反光背景上方读数[19]。测量纸片周围抑菌环直径，以生长显著减少的点为准，取最接近的整毫米数。经常会遇到抑菌环边缘针尖样小菌落或抑菌环内大菌落，这种情况可以忽略。如生长不充分，则在48 h阅读平板（表134-5）[19]。当检测念珠菌时，已经确定氟康唑、泊沙康唑、伏立康唑和卡泊芬净QC抑菌环直径范围[99]。

（五）酵母菌基于琼脂的可供选择的方法

梯度条试验 Etest试验是第一个被生产使用的抗菌药物梯度条试验，Liofilchem试条在欧洲部分国家和北非也可以购得。这种检测基于抗微生物药物在琼脂培养基表面的塑料条中沿稳定浓度梯度扩散的原理。现在出售的梯度条有两性霉素B、氟康唑、氟胞嘧啶、酮康唑、伊曲康唑、艾沙康唑、泊沙康唑、伏立康唑、阿尼芬净、卡泊芬净和米卡芬净。FDA已经批准氟康唑、伊曲康唑、伏立康唑和氟胞嘧啶Etest条应用于临床，所有这些试条也已获得CE认证。Etest和参考方法MIC的一致性取决于菌种、检测药物[68,100]和培养基。能为Etest法检测MIC提供最佳性能的培养基是添加2%葡萄糖的固化RPMI培养基，判读结果需要专业知识并严格遵守厂商说明书，对光滑念珠菌和克柔念珠菌判读结果还需如下附带条件，如果抑菌区域清晰可见，就可以很容易地在抑菌区域与Etest条相交处读取MIC值。可能发生的问题是没有经验的阅读者错误将抑菌区域内微弱背景生长的小菌落判定为耐药，这种情况最常见于氟康唑，故假如一株分离菌用Etest方法检测，意外发现对氟康唑耐药，就应该用参考方法重新检测。就这一点而言，保证试验用的是纯培养物至关重要，例如，用白色念珠菌和光滑念珠菌混合物进行试验，读取的是更敏感的白色念珠菌的敏感性，而在白色念珠菌抑菌区域内较小的光滑念珠菌菌落，会被认为是拖尾而忽略。Etest可用于怀疑对两性霉素B潜在耐药酵母菌的检测[64,101]。在检测念珠菌对唑类和棘白菌素类敏感性方面，Etest与CLSI方法关联性好[102-104]。很显然，用参考试验方法制订的折点不一定能应用于商业方法得到的结果。最近的一项研究表明，如果将修订的CLSI卡泊芬净的折点，应用于一些光滑念珠菌和克柔念珠菌的E-tsest结果，有相当数量菌株会被错误分类为中介[105]。这项发现在评估MIC恰好高于CLSI折点的光滑念珠菌感染患者的临床应答时被证实[106]。

（六）直接敏感性试验

虽然大多数已经发布的敏感性数据都是由传代培养微生物后得出的，但有研究者尝试对真菌血症患者血液标本直接进行试验，这样可以更进一步减少完成试验所需要的培养时间[107-108]。Guinea和同事们[108]最近开展了一项研究，对195个预收集和133个实验室模拟的种类齐全的临床酵母菌标本进行试验，试验表明对氟康唑、伏立康唑、艾沙康唑(isavuconazole)和卡泊芬净，直接E-test 24 h内获得的结果，与CLSI M27-A3参考方法48～72 h得到的结果有很高的一致性。

（七）蛋白质组学和抗真菌药物敏感性试验

早期的研究工作表明，蛋白质组学方法可用于检测对几类抗真菌药物耐药性的存在[109-110]。酵母菌细胞蛋白质成分变化与其在不同药物浓度

中细胞生长的抑制有关，对这种变化进行分析也许能开发出新一代的抗真菌药物敏感性试验。Marinach 和同事[109]研究了不同浓度氟康唑对菌株产生的光谱范围的影响，研究的菌株为 1 株标准株和 16 株其他的对氟康唑具有不同敏感性和不同耐药机制的白色念珠菌。定量分析了实验光谱与对照光谱的差异，以便得到一个最低光谱变化浓度终点，浓度终点代表最低药物浓度，可以检测其质谱范围的变化。最低光谱范围变化浓度结果与标准的 CLSI 方法得到的 MIC 结果之间具有高度相关性（100%±2 个倍比稀释度，94%±1 个倍比稀释度），并且仅有 1 株分离菌被分到不同的敏感性类别中（小错误）。此方法也被应用于分析卡泊芬净敏感性试验，该试验检测了携带和未携带已知的与耐药有关的 *FKS* 突变的 34 株酵母菌和 10 株真菌[110]。与之前的试验一样，比较了最小光谱范围变化浓度结果[或针对霉菌的最低有效浓度（MEC）]与通过适当的 CLSI 方法获得的 MIC[或针对霉菌的最低有效浓度（MEC）]结果。对于酵母菌和霉菌，两者结果基本上 100%符合（±2 个倍比稀释度），分类一致性为 94.1%。

基于基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱（MALDI TOF-MS）的方法，似乎是一个可靠和重复性好的检测抗真菌药物敏感性试验的工具，与 CLSI 和 EUCAST 方法 24 h 相比，其孵育 15 h 后可获得分析结果，此外，能对酵母菌和霉菌产生客观分析结果。虽然目前此法与全部敏感性试验方法一样检测费时和费力，但该方法有潜力用于折点检测，以提供一个特定菌株抗真菌药物耐药性的早期监测方法，或作为新兴耐药菌群的筛选工具，但该方法仍需进行多中心评估认证及扩充可检测抗真菌药物的种类[110-111]。

（八）分子生物学方法

有多种机制会导致念珠菌对唑类抗真菌药物敏感性降低，或产生明显的耐药，其中包括细胞壁成分改变导致摄取减少、外排增加，上调靶基因表达和靶位酶的突变等（第 133 章）。一个细胞可能包含其中一种或多种耐药机制，逐步获得耐药机制似乎更常见[112-113]。因此，分子生物学检测耐药性的前提必须是一个多重耐药机制，并且检测的不只是表型，还要能检测管家基因的上调。最近，应用全基因组测序技术可以有效检测已知的耐药机制，但目前这些方法只适用于实验室研究领域[11]。对棘白菌素耐药通常集中在 FSK1 基因的两个热点区域的突变，尽管其他突变在实验室环境已被诱导[43]。这些突变能比较容易地通过简单的测序，包括焦磷酸测序来检测[114]。最近一项研究证实了一个基于 Luminex 多重试验的实用性，该方法可用于高通量筛选，并且证明检测 102 株 FSK1 和 FSK2 热点区域突变的光滑念珠菌的结果与 DNA 测序结果 100%一致[115]。然而，分子技术无法检测之前未知的耐药机制，因此，必须通过表型检测来确认。

七、霉菌标准肉汤稀释法

随着条件致病菌的广泛出现，以及最常见致病霉菌中固有和自发耐药的不断报道，霉菌的抗真菌药物敏感性试验变得越来越重要[1]。CLSI（M38-A2）[16]和 EUCAST（E. Def9. 1）[18]已研制了针对丝状真菌的微量肉汤稀释法，其方法与酵母菌方法相似，总结于表 134-6。

表 134-6　CLSI M38-A2 丝状真菌文件和 EUCAST 产分生孢子霉菌的微量肉汤稀释法抗真菌药物敏感性试验指南[a]

参数	CLSI M38-A2	EUCAST E. Def. 9. 1N
检测微生物	丝状真菌	产分生孢子霉菌
肉汤培养基	MOPS 缓冲液（0.165 M）缓冲的 RPMI-1640 肉汤和 0.2% 葡萄糖，pH 7.0，25℃	MOPS 缓冲液（0.165 M）缓冲的 RPMI-1640 肉汤和 2.0% 葡萄糖，pH 7.0，25℃
微量稀释板	具有 300 μl 容积圆底孔、无菌塑料的一次性 96 孔板	具有 300 μl 容积平底孔、无菌塑料的一次性 96 孔板
药物稀释	添加 2×2 倍药物稀释用溶剂	当加入接种物时，添加 2×2 倍药物稀释用双倍强度的 RPMI 溶剂，以达到允许的稀释系数

（续 表）

参数	CLSI M38-A2	EUCAST EDef. 9. 1N
药物稀释范围：		
唑类	0.03～16.00 mg/L	0.015～8.000 mg/L
两性霉素 B	0.03～16.00 mg/L	0.03～16.000 mg/L
棘白菌素	0.015～8.000 mg/L	0.03～16.00 mg/L
皮肤癣菌试验：		
环吡酮胺	0.06～32.000 mg/L	
灰黄霉素	0.125～64.000 mg/L	
氟康唑		
伊曲康唑	0.001～0.500 mg/L	
伏立康唑		
特比萘芬		
泊沙康唑	0.004～8.000 mg/L	
制备好的测定板的储存	用塑料袋密封，储存于－70℃或更低可长达 6 个月	用塑料袋密封，储存于－70℃或更低可长达 6 个月（棘白菌素不多于 2 个月）或－20℃储存不多于 1 个月（非棘白菌素）
接种物制备	在 35℃，马铃薯葡萄糖琼脂（燕麦粉琼脂适于红色毛癣菌）上孵育试验菌株 7 天，或者直到获得良好的孢子，对于某些属可以是 48 h。向培养物加 1 ml 无菌的 0.85%盐水（加 0.01 ml 吐温 20 将有助于曲霉）；用移液管尖端轻轻探划菌落。静置 3～5 min，然后吸出上层均匀悬浮液到无菌管。漩涡混匀 15 s	在 35℃，马铃薯葡萄糖琼脂（或其他产孢子培养基）上孵育试验菌株 2～5 天，或若需要可更长。用 5 ml 无菌水加 0.1%吐温 20 覆盖菌落，无菌棉签擦拭菌落，随后转移悬浮液至无菌管。漩涡混合器上混匀 15 s，然后适当稀释用血细胞计数仪计数。若悬浮液含有菌丝，用 11 μm 孔径的过滤器过滤，或如果团块仍然在下，再次漩涡混匀 15s
接种物原液悬浮液	接种物原液悬浮液对于曲霉属、拟青霉属、皮炎外瓶霉属和申克氏孢子丝菌，使用分光光度计在 530 nm 处，通过添加无菌生理盐水调整光密度到 0.09～0.13；镰刀菌、尖端赛多孢、奔马赭霉、斑替枝孢霉和毛霉 0.15～0.17；链格孢和弯孢属（以前的离蠕孢菌属）0.25～0.3	血细胞计数仪计数孢子，用无菌蒸馏水调整接种物浓度至 $(2～5)\times10^6$ CFU/ml，30 min 内使用
检测接种物	用培养基 1∶50 稀释悬浮液，获得 2×最终接种物 $0.4\times10^4～5\times10^4$ CFU/ml[NB：丝孢菌属、弯孢菌属和链格孢菌属可能需要更小的稀释倍数（50%）]	用无菌蒸馏水 1∶10 稀释悬浮液，获得最终工作接种物 $(2～5)\times10^5$ CFU/ml，工作接种物必须在制备后 30 min 内使用
测定板接种	100μl 稀释的实验接种物加 100μl 2×药物浓度；最终浓度	100 μl 稀释的实验接种物加 100 μl 2×药物浓度；最终浓度
接种物验证	取 0.01 ml 的 1∶10 稀释的接种物或未稀释的皮肤癣菌接种物到沙氏弱葡萄糖琼脂平板，28～30℃孵育；5 天内每天观察，当可见菌落后计数菌落	接种后立即从生长对照孔吸取 20 μl，加到 2 ml 含 0.1%吐温的无菌蒸馏水中稀释，漩涡混合器上混匀，取 100 μl 涂布于合适的琼脂平板，孵育 24～48 h 后应有 50～250 个菌落
生长对照	100μl 稀释过的接种物加 100 μl 无药培养基（或加 2%溶剂）	100 μl 稀释过的接种物加 100 μl 无药培养基（或加溶剂）
无菌对照	微孔板的第 12 排孔可用做无菌对照（只有无药培养基，无接种物）	微孔板的第 12 排孔可用做无菌对照（只有无药培养基，无接种物）
QC 菌株	选择接近所有测试药的中间范围的 MICs 菌落作为 QC 菌株。基于试验频率已建立的 QC 试验规则	至少两株结果与中间范围相近的 QC 菌株
孵育	35℃无振荡孵育，或 30℃，假如更适合试验菌种	无振荡，大气环境，(35±2)℃
阅读时间	根据菌种 21～74 h；棘白霉素，24 h 或一旦对照孔有融合生长	24～48 h；毛霉应在 24 h 阅读；其他霉菌 48 h，偶尔 72 h 以使对照孔得到充分生长
MIC 或 MEC 判定	阅读镜帮助下目测评估	阅读镜帮助下目测评估
两性霉素 B	阻止任何可见生长的最低药物浓度（100%抑制）	阻止任何可见生长的最低药物浓度（100% 抑制）。忽略表面的单个菌落和“跳孔”

（续　表）

参数	CLSI M38-A2	EUCAST EDef. 9. 1N
伊曲康唑		
泊沙康唑		
雷夫康唑		
伏立康唑		
棘白菌素	MEC，与对照孔的融合生长相比，导致形成小、圆、紧密菌丝的最低药物浓度	MEC，与对照孔的长而不分枝菌丝相比，观察到形成异常、短而分枝的菌丝簇的最低浓度
环吡酮胺、灰黄霉素、特比萘芬	相比对照孔生长减低 80%	
比色修正	制备测定板时，向 2×浓度 RPMI 培养基中，加 2×浓度比色指示剂改良刃天青，可以帮助伊曲康唑进行终点解释	

注：[a]数据来源于参考文献[16]和[18]

(一)微量稀释法

1. 标准培养基和药物原液　CLSI 方法使用的试验培养基与酵母菌试验推荐的相同，为 MOPS 缓冲的标准 RPMI 培养基，而 EUCAST 方法添加了 2% 葡萄糖于培养基中。如酵母菌试验[15,17]，以及 CLSI M38-A3 和 EUCAST Edef 9.1 文件[16,18]所描述方法制备药物原液。

2. 接种物的制备　由于非发芽分生孢子更容易制备和标准化，这里描述的接种物制备方法与 2 个文件中内容大致相同。CLSI 方法制备受试菌株接种物，首先使受试霉菌在马铃薯葡萄糖琼脂斜面(对于红色毛癣菌使用燕麦粉琼脂)35℃培养 7 天，或直到获得良好的孢子，对于某些菌属可以是 48 h。然后，向每个斜面加入 1 ml 无菌的 0.85%盐水(加 0.01 ml 吐温 20，对曲霉将有所帮助)，用移液管尖端轻轻探划菌落表面。吸出所得到的混合物至无菌试管中，静置试管 3～5 min，使大的颗粒物沉淀。上层均匀悬浮液是非发芽的分生孢子、孢囊孢子和菌丝片段的混合物，漩涡混匀 15 s。使用分光光度计在 530 nm 处测量浊度，对于曲霉属、拟青霉属、皮炎外瓶霉属和申克孢子丝菌，用无菌生理盐水调整光密度到 0.09～0.13；对于镰刀菌、尖端赛多孢霉(以前称奔马赭霉)、斑替枝孢霉和毛霉，调到 0.15～0.17；对于弯孢菌(以前的离蠕孢菌)和链格孢菌，调到 0.25～0.3。然后，将配好的储备接种物悬液用培养基 1∶50 稀释，获得 2×最终接种浓度(0.4～5)×10^4CFU/ml。某些菌属(如丝孢菌属、弯孢菌属和链格孢菌属)可能需要更低的(50%)稀释倍数[16]。

EUCAST 方法与 CLSI 法不同，其接种物浓度更高，且利用血细胞计数仪计数，而不是分光光度法测定。使用棉签擦取马铃薯葡萄糖琼脂斜面，35℃生长 2～5 天的菌落上的孢子，再将收获的分生孢子加入含 0.1%吐温 20 的 5 ml 无菌水中，然后将悬浮液转移至无菌试管中，在漩涡混合器上混匀 15 s。将得到的悬浮液稀释到适合于血细胞计数仪计数。如果悬浮液中含有团块，则再次漩涡混匀 15 s，若有菌丝存在，应使用 11 μm 孔径的过滤器进行过滤。将接种物用无菌蒸馏水调整到(2～5)×10^6CFU/ml，再用无菌蒸馏水 1∶10 稀释，获得(2～5)×10^5CFU/ml 的最终工作接种物，工作接种物必须在制备后 30 min 内使用。

3. 药物稀释和霉菌微量稀释试验的操作　与上述酵母菌试验一样，进行药物稀释，并分配到无菌的、一次性的多孔微量稀释板内。试验当天，向每个孔接种 100 μl 稀释的分生孢子或孢囊孢子悬浮液。

4. 霉菌微量肉汤稀释法孵育和 MIC 测定　所有的微量稀释板在 35℃无振荡孵育 21～74 h 后肉眼判定 MIC。大多数毛霉应在孵育 24 h 判读结果，而大部分其他机会致病真菌是 48 h；偶尔可能需要 72～74 h，使对照孔能得到充分生长。双相真菌试验可能需要孵育 5～7 天。当检测两性霉素 B、伊曲康唑、伏立康唑和泊沙康唑时，霉菌 MIC 终点判定标准是能完全抑制其生长的最低药物浓度。评估棘白菌素类药物的终点测定存在一定难度，需要借助显微镜评价 MEC 值(见下文)，对大多数霉菌孵育 21～26 h 判读，而丝孢菌属是 46～72 h。

5. 棘白菌素类：MEC 当检测棘白菌素类时，大多数曲霉分离株表现出拖尾生长，传统的MIC测定可能将这些拖尾菌株分类成对卡泊芬净耐药。当更仔细地对微量稀释孔进行检查，可以发现紧密、圆形小菌落的存在。显微镜下观察发现小菌落有相应的重要形态学改变，菌丝生长异常，呈短小而具肿胀芽管高度分枝长丝。Kurtz和同事[116]将产生这种形态学变化的药物浓度定义为MEC，以便与传统的MIC，相区别。一项多中心研究证明，在17个参与研究的实验室中有14个实验室证实了卡泊芬净的MEC是可靠的终点[117]，其中8个实验室的另一项对阿尼芬净评价研究中，发现了阿尼芬净的MEC对各种霉菌都能提供可靠的终点[118]。最近，一项涉及5个实验室的国际性研究，能够确定卡泊芬净对曲霉野生型分布和流行病学临界值[119]。然而，值得注意的是，微量肉汤稀释法未能确定从1例治疗失败患者提取的非野生型菌株，该菌株经动物模型确认耐药，甚至这些菌株与Etest条未产生椭圆形抑菌区域[120]。由于某些实验室报道的结果相互矛盾，因此，需要谨慎对待这个试验方法，并进一步完善[117]。

(二)宏量稀释法

霉菌的微量肉汤稀释法和宏量肉汤稀释法获得的结果具有很好的一致性[121]。这种试验形式可能更适合于检测那些需要更长孵育期的菌种，以解决延长孵育过程中微量滴定板中水分蒸发问题。宏量稀释试验法的条件在CLSI M38-A2文件中有所描述[17]。简而言之，接种物原液悬浮液的制备和药物稀释同微量稀释试验。100倍药物稀释应该用RPMI培养基1∶10稀释，以获得宏量稀释试验所需的10倍药物浓度。用培养基1∶100稀释原液接种物悬浮液，获得(0.4～5.0)×10^4 CFU/ml。将10倍药物浓度的药液分装到12 mm×75 mm无菌试验中，每管0.1 ml。在试验当天，向每管接种0.9 ml相应的菌悬液。35℃无振荡孵育，并观察是否有可见生长。依照上述霉菌微量稀释法来判定MIC。

(三)霉菌试验的质量控制

可以采用任何一种酵母菌菌株或者宛氏拟青霉ATCC MYA-3630作质控菌株，质控菌株需与其他霉菌菌株以相同方式检测，或按上述酵母菌的方式检测，每次评价一株菌株对任何抗菌药物敏感性时，都应包括质控菌株。此外，其他霉菌已被CLSI和EUCAST选定为参考菌株(表134-3)[17,19]。

(四)霉菌折点的预期结果与解释

EUCAST已出版了某些曲霉对两性霉素B和对霉菌有效唑类药物的临床折点(表134-7)。CLSI M59文件也给出了部分霉菌的流行病学临界值[174]。唑类耐药对曲霉病临床治疗失败已经明确讨论过，但针对曲霉病和透明丝孢霉菌病的临床治疗失败与两性霉素B MIC>2 mg/L之间的关联性报道较少[2,122-124]。也有报道用卡泊芬净治疗霉菌感染患者，但发生治疗失败和突破性感染[120,125]。此外，有治疗其他真菌群感染的经验，如赛多孢子菌，发现其对伏立康唑体外敏感性大于两性霉素B，用该药治疗赛多孢子菌感染患者，可获得更佳的临床结果[126]。

表134-7 EUCAST曲霉菌折点

抗真菌化合物	折点[a](mg/L)				
	黄曲霉	烟曲霉	构巢曲霉	黑曲霉	土曲霉
两性霉素	IE[b]	1/2	Note	1/2	靶位太少
伊曲康唑	1/2	1/2	1/2	IE[b]	1/2
泊沙康唑	IE[b]	0.125/0.25[c]	IE[b]	IE[b]	Note[d]
伏立康唑	Note[d]	1/2	Note[d]	Note[d]	Note[d]

注：[a]折点为S≤X，R>Y(除了修订的治疗光滑念珠菌的氟康唑折点)，"I"类(如果存在)简单解释为S和R折点之间的值。[b]IE(证据不足)-MIC高于烟曲霉。没有足够证据表明此菌种是良好的治疗目标。[c]提供足够药物水平可以实现。[d]注意这些菌种MIC与烟曲霉相似，但临床数据不足以建立一个折点

对于大多数霉菌（包括大多数毛霉），通过参考方法测定两性霉素 B 的 MIC≤1.0 mg/L[7,127-128]。有报道，淡紫紫孢菌（*Purpureocillium lilacinum*）、大多数赛多孢子菌和假阿什利菌，以及某些链格孢菌、曲霉（尤其是土曲霉和黄曲霉）、镰刀菌、马尔尼菲篮状菌、瓶霉和申克孢子丝菌[7,39,128-129]具有高两性霉素 B 的 MIC（>2 mg/L），由这些菌株引起的感染常难以治疗[130]。

EUCAST 制订的两性霉素 B 对烟曲霉和黑曲霉的折点是≤1.0 mg/L（敏感），>2.0 mg/L（耐药）（表 134-7）。考虑到土曲霉并非两性霉素 B 的有效治疗对象，故尚未制定土曲霉折点。另外需要注意的是黄曲霉，因其两性霉素 B MIC 情况与土曲霉相似，在动物模型中也报道了不同的治疗效果[131]。用于制订构巢曲霉两性霉素 B 折点的临床数据不足。

伊曲康唑对烟曲霉的 MIC 通常也是≤1.0 mg/L，对大多数其他真菌是≤2.0 mg/L；焦曲霉/*Aspergillus calidoustus*（某些菌株）、茄病镰刀菌、尖孢镰刀菌、淡紫紫孢菌、申克孢子丝菌、多育赛多孢子菌、长枝木霉和许多毛霉等例外，它们具有高的 MIC 值[7,129,132]。EUCAST 已经建立伊曲康唑对黄曲霉、烟曲霉、构巢曲霉和土曲霉的折点（敏感≤1 mg/L；耐药>2 mg/L）（表 134-7）。烟曲霉唑类耐药与靶基因突变有关（*cyp51A* 基因、外排泵和靶基因的上调，以及 HapE 的突变）（第 133 章）。CYP51A 突变可以赋予菌株只对伊曲康唑耐药，或对伊曲康唑和泊沙康唑耐药，或可引起对唑类泛耐药。最近，一个新的耐药基因型（TR_{46}/Y121F/T289A）于环境菌株中被发现，该基因型可使菌株对伏立康唑和艾沙康唑呈高水平耐药，但对伊曲康唑和泊沙康唑敏感性多变[133]。因此，伊曲康唑联合伏立康唑可以作为曲霉初始的唑类耐药筛选药物。

伏立康唑、艾沙康唑和泊沙康唑具有广谱抗真菌活性，特别是艾沙康唑和泊沙康唑，已有报道其对毛霉具有良好的体外活性[127-128,134-136]。目前，一些出版物中使用 CLSI 和 EUCAST 的方法检测得到的烟曲霉的流行病学折点已经取得一致性共识[137-139]。达成共识的流行病学临界值是：伊曲康唑、拉夫康唑、伏立康唑≤1.0 mg/L，泊沙康唑≤0.25 mg/L。对于艾沙康唑，EUCAST 推荐临界值为 2 mg/L，但 CLSI 推荐 ECV 为 1 mg/L[140]。EUCAST 折点反映了这些公认的 ECOFF：伏立康唑对烟曲霉、黄曲霉、构巢曲霉和土曲霉的折点是≤1.0 mg/L（敏感），>2.0 mg/L（耐药）；泊沙康唑对烟曲霉和土曲霉的折点是≤0.125 mg/L（敏感），>0.25 mg/L（耐药）（表 134-7）。泊沙康唑和艾沙康唑的折点较保守，低于 ECOFF 一个梯度，原因是目前口服溶液具有可变的生物利用度且药动学/药效学数据表明仅刚覆盖野生型 MIC。

目前，已发表文章指出在需要长期使用这些药物的某些慢性临床病症中，发现烟曲霉对伊曲康唑耐药和某些菌株对伏立康唑交叉耐药[2,141]。近年来，荷兰和其他国家相继报道了烟曲霉临床菌株唑类耐药，为此，荷兰首先对国家级治疗指南进行了修订，鉴于其高耐药率，建议将联合药物治疗作为一线治疗方案。这与为保护植物而在环境中大量使用唑类药物有关，并且已建立了环境中这种耐药株（其中大多数含有一种独特的 TR_{34}/L98H 或 TR_{46}/Y121F/T289A）突变的频率，以及与抗真菌农药全球使用比例的相互关系。

耐药频率不同（最近的综述请见参考文献[9]和本书第 133 章）。棘白菌素对大多数曲霉的 MIC/MEC 通常是<1.0 mg/L[121,142]。然而，一项研究用 EUCAST 的方法检测了 81 株黄曲霉，发现这些菌株一致地对卡泊芬净、阿尼芬净和米卡芬净耐药，MIC_{50} >16.0 mg/L[142]。相比之下，采用 CLSI 方法的研究报道指出，432 株黄曲霉中有 95% 菌株卡泊芬净 MIC≤0.25 mg/L[120]。经常有报道棘白菌素对其他真菌菌株有较高的 MIC/MEC，通常表现低到中等活性[39,142]。然而，有报道显示棘白菌素对某些双相真菌、枝顶孢真菌、瓶真菌和尖端赛多孢霉的 MIC<1.0 mg/L[142-143]。

对于棘白菌素，根据菌株野生型分布和流行病学临界值，将曲霉描述为敏感或者非敏感，而根据对大量分离菌株多中心协作研究，提出了种特异的卡泊芬净 ECV，范围为 0.25～1.00 mg/L[121]。然而，如同已报道的卡泊芬净对念珠菌的检测一样，假如忽略实验室和时间的差异，比较各种发表的文献，会发现卡泊芬净对曲霉的 MIC 范围存在不可接受的变异。在这种变异减小到可接受的水平以前，采用 ECOFF/ECV 或者尝试建立折点都是没有意义的[144-147]。由于现有临床数据表明烟曲霉可能对棘白菌素存在获得性耐药，而由这种菌株引起的感染可能会治疗失败，因此，目前最重要的是完善和验证棘白菌素对曲霉的检测[120]。

(五)皮肤癣菌的微量肉汤稀释法

相比其他霉菌,皮肤癣菌的药物敏感性实验已经滞后了,但经过稍微修改,M38-A2 的微量肉汤稀释法已经成功适用于皮肤癣菌检测[148]。这是很重要的进步,因为特比萘芬耐药红色毛癣菌已被报道[149]。这些修改包括当检测红色毛癣菌时,为了诱导分生孢子形成,使用燕麦琼脂制备接种物,以及 35℃孵育 4~5 天判定 MIC(80%生长抑制的终点)。2 株毛癣菌已被确认为标准菌株(表 134-3)。

(六)比色法

对于霉菌,有学者也评估了 YeastOne 法,认为此法似乎是一种合适的方法,其产生的结果与参考方法具有可比性[150-152]。当四唑盐(黄色)被裂解成甲臜衍生物(紫色)时,使用微量滴定板分光光度计,通过阅读 Alamar Blue 产生的颜色变化(光密度),测量新陈代谢的活动,用于真菌的检测也已被评估[153-154]。此外,进一步的评估,包括实验室间的研究,需要更多的菌株和菌种,特别重要的是,这类研究应尽可能地包括野生型和尽可能多的耐药性菌株。

(七)丝状真菌以琼脂为基础可选择的方法

如酵母菌一样,以琼脂为基础的方法已被用于霉菌敏感性试验,包括琼脂稀释法、纸片扩散法、Etest 法和半固体琼脂[155-157]。

1. 琼脂稀释法 琼脂稀释法涉及制备 10×2 倍稀释药物,并将其加入熔化的琼脂中。将待测菌株悬浮液接种到含药物的平板。在一项研究中,用琼脂稀释法和肉汤稀释法检测的伊曲康唑耐药菌株的结果,与小鼠感染模型的结果有良好的相关性[156]。由于无可用的标准方法,接种物的大小在不同研究中有所不同。这种方法尤其适用于需要高通量的环境监测,以及对临床培养物唑类耐药的首次和早期筛查,因为此种试验可以在获得纯培养物之前,直接从原始平板进行检测。鉴于此,已研制出了四孔平板(VIPcheck, Neijmegen, the Netherlands),其中 3 孔分别含不同浓度溶于 RPMI-1640 和 2%葡萄糖琼脂的抗菌药物(伊曲康唑 4 mg/L、泊沙康唑 0.5 mg/L、伏立康唑 1 mg/L),还有一个对照孔[29]。将 25 μl 待测菌悬液接种监测平板,37℃孵育 24 和 48 h 后检查结果。假设无药对照孔在 48 h 后有足够的生长,并且包含唑类药物的琼脂上没有生长,那么该菌株可报道为对伊曲康唑、泊沙康唑、艾沙康唑和伏立康唑敏感。这种筛选平板的使用,可降低 90%需要进一步用参考法检测菌株的数量,同时为唑类敏感模式提供早期指征(图 134-1)。

2. 纸片扩散法 纸片扩散法用于检测大范围的机会致病霉菌对两性霉素 B、阿尼芬净、卡泊芬净、米卡芬净、伊曲康唑、泊沙康唑和伏立康唑的敏感性已被评估[157-160]。CLSI 药敏试验分会已经批准了一种测试卡泊芬净、两性霉素 B 和三唑类对非皮肤癣菌丝状真菌的方法(M51-A1)[20]。与检测酵母菌的方法相似(M44-A2)[19],但所采用的 MH 琼脂培养基未补充亚甲蓝或增加葡萄糖,因为多中心协作研究发现,这些补充物对许多霉菌是不适合的[158]。按照 CLSI M38-A3 要求制备接种物浓度,接种平板与酵母菌纸片扩散法相同。35℃孵育,毛霉 16~24 h、曲霉 24 h、其他霉菌 48 h,在圆形抑菌环周围生长的菌落应为融合草坪样,测量抑菌环直径,取值到最接近的整毫米[158]。当检测大量多种类霉菌菌株时发现,这种方法所得的结果与 CLSI M38 结果相比,总的分类一致性表现出良好的水平。然而,关于使用两性霉素 B 纸片,检测除了毛霉以外的菌种还有保留意见,伊曲康唑纸片现在不应被用于检测毛霉,但其适合于其他菌属[158]。已选择 3 株菌株作为 QC 菌株(烟曲霉 ATCC MYA-3626、宛氏拟青霉菌 ATCC MYA-3630 和克柔念珠菌 ATCC 6258),并已建立了两性霉素 B、伊曲康唑、泊沙康唑和伏立康唑对 3 株菌株的抑菌环直径范围[161]。

3. Etest 和其他梯度条 许多研究已经评估了 Etest 检测霉菌病原体的效用[159,162-166]。由于拖尾现象不是检测大多数霉菌对唑类敏感性时面对的主要问题,所以 Etest 抑菌椭圆形通常是锐利的,故而很容易解释 MIC。棘白菌素则与之相反,抑菌区域内可能存在相当重的背景生长,而抑菌椭圆形区域内有更浓重的生长往往表明耐药[120]。总体而言,Etest 与 M38-A 法比较表明,检测三唑类(>90%)比两性霉素 B(>80%)具有更好的一致性。两性霉素 B 对黄曲霉、尖端赛多孢子菌和多育赛多孢的 Etest 法 MIC 值,通常高于参考值,尤其在孵育 48 h 后[164]。在一个案例研究中,发现 1 株烟曲霉对唑类多重耐药,具有相应的基因突变,而通过 Etest 法检测也表现对卡泊芬净耐药,

MIC>32 mg/L，但采用微量肉汤稀释法没有检测出耐药[120]。经过分子生物学方法检测，表明此菌株具有 *FKS* 基因表达上调，以及在动物感染模型中显示对卡泊芬净敏感性降低。对于霉菌应该解决的问题是，Etest 法的可靠性和其 MIC 值的临床相关性。尽管两性霉素 B、阿尼芬净、酮康唑、泊沙康唑、伏立康唑和卡泊芬净的 Etest 条已经有商业化产品，但美国 FDA 迄今还没有批准任何抗菌药物试剂条在临床霉菌敏感性试验中使用。

（八）分子生物学方法

与酵母菌相比，霉菌的耐药机制似乎较少，所以更易于应用分子生物学方法检测丝状真菌的耐药性。目前已开发多重 PCR 法，检测导致烟曲霉对三唑类耐药和交叉耐药的 3 种最常见的 *cyp51A* 基因突变[167]。商业化多重检测试剂盒 AsperGenius (PathoNostics B. V. Maastricht, The Netherlands)已研发并已经 CE 认证用于临床支气管肺泡灌洗液标本检测和鉴定曲霉菌种，同时还可检测 4 个烟曲霉唑类耐药靶标。此类试验可能是有益的，特别是对于未使用过唑类药物的患者，因为其包括最常见的环境耐药机制，也见于侵袭性感染分离菌株中(TR_{34}/L98H 和 TR_{46}/Y121F/T289A)，已有文章证实了该方法的临床实用性[168-169]。然而，对于慢性曲霉感染患者，各种各样的 CYP51A 突变与单一、多重或泛唑类耐药有联系，并且发现高达 40%的耐药菌株具有除靶基因突变之外的其他潜在机制，因此，导致无突变的阴性预测值低得令人无法接受[2,170]。对曲霉棘白菌素耐药背后的分子机制了解尚少。*FKS1* 基因突变已经在实验室菌株中实现诱导，并赋予菌株耐药性，但迄今为止还未在临床菌株中检出。在经细胞壁消化后培养于含卡泊芬净培养基的菌株中发现了非涉及 *FKS* 靶基因的其他机制[171]。通过 Northern 印迹和实时 PCR 基因表达分析，显示了 *FKS1* 基因的过表达，是导致一株从卡泊芬净治疗失败患者分离的烟曲霉敏感性减低的原因[120]。

（九）杀真菌活性

CLSI 一项研究表明，实验室可以可靠地进行 MFC 试验[37]和时间-杀菌曲线。如上所述，与所观察到的酵母菌相反，对于各种常见和罕见的机会性霉菌病原体，唑类似乎有一定程度的杀菌活性。不同霉菌菌种的唑类 MFC 从<0.03 mg/L 到>16 mg/L 不等[7,37]。然而，为了可靠地评估 MFC 终点在患者管理中的潜在价值，需要对该方法进行标准化。这些标准化工作应该包括体外结果与清除动物模型中感染靶器官微生物的关系，以及 MFC 数据的进一步临床表现。最近的研究将一种代谢活性指示剂[2,3-双(2-甲氧基-4-硝基-5-磺苯基)-2H-四唑-5-羧酰]掺入微量肉汤稀释法基础配方中，检测两性霉素 B 和伏立康唑的杀真菌活性，显示杀真菌效果为浓度依赖性 S 形模式[172]。这样的发展将需要细致评估和标准化。

八、总结与结论

自 20 世纪 80 年代初正式开始药敏试验以来，在酵母菌和丝状真菌的抗真菌药物敏感性试验领域，已经取得了很大的进展。标准化的宏量和微量肉汤稀释法已经用于检测霉菌和酵母菌，标准化纸片扩散法亦用于全身活性抗真菌药物敏感性的检测。在确立试验结果与不同临床情况下，患者对许多当前可用抗真菌药物治疗应答之间关系的研究方面，也正取得进展。对于常见酵母菌与大多数全身活性药物已建立了折点，而对烟曲霉也建立了某些药物折点。此外，某些商业方法也已经被批准用于念珠菌抗真菌药物敏感性试验，但对于这些方法，应该注意根据 ECOFF/ECV 选择合适的折点，这些折点可能与标准参考方法产生的折点不一致。通常情况下，鉴定酵母菌或者霉菌病原体到种的水平足以指导初始治疗(第 132 章)，但考虑到一些国家日益增多的烟曲霉对唑类抗真菌药物的耐药问题，鼓励使用含药物筛选的琼脂培养基，用于原始分离菌株的筛选，以提供一个早期耐药指示，同时分离纯化菌株用于参考法试验。在应用标准化方法和美国与欧洲选择折点的原则方面，已强烈达成共识，这意味着国际上商定的折点可以应用于某些药物真菌组合。这有助于改善全球耐药谱的监测，并将对临床相关折点的进一步发展有所帮助。

参考文献请扫二维码查阅

第八部分　寄生虫学



第八部分 寄生虫学

第17篇

总　论

第135章　人体真核寄生虫的分类和命名

SINA M. ADL, BLAINE A. MATHISON

（马莹　译；胡媛、曹建平　审校）

对于重要的医学真核寄生虫，传统上认为包括原虫、节肢动物和蠕虫，蠕虫包括线虫、吸虫、绦虫和棘头虫。历史上，真菌如微孢子虫和肺孢子虫曾归于寄生虫，但在本书中，它们归于真菌。尽管真核生物的分类有了现代的转变，但本手册的之前版本尽仍可能地使用了经典的分类法。在本版中，笔者采用了生物学家在研究中已经使用了十多年的系统。为了让对这些变化不熟悉的临床微生物学家适应这一转变，笔者在现代名称旁提供了前版本所使用的名称。

生物种的现代分类旨在反映生物的进化历史。林奈等级分类系统仍然用于植物学和动物学，遵循《国际动物学命名法》和《藻类、真菌和植物命名国际规范》（不再是植物学）的规则，每个规则都有其监督机构。以前将真核生物的生物学分成植物（和真菌）和动物，这在当时是不错的，但由于现在不再是这种情况，所以有必要采用一种新的方法来适应与所有其他群体都有分歧的原生生物的多样性。2种命名系统的规则和建立有着不可调和的矛盾，因此，只有在一方忽略规则或一方开发了2个平行分类时，才能将它们应用于所有真核生物。相反，现代系统允许寄生虫学家、植物学家和动物学家保持传统惯例，并将它们融入到原生生物多样性的分类中。对深入阅读感兴趣的读者可阅读Adl等[1-2]的著作，这些著作为当前使用的系统提供了适当的背景总结。Adl等[3]还提供了进一步的探讨。现代系统最大的变化是，在原生动物中不再正式指定复杂分类体系中高等级的命名（如界、门、纲和目）而只有属和种的名称被正式保留，尽管大多数人认为这种命名更严格，但是，动物分类学家常常保留了分类中的更高等级。在动物学法规中，不需要更高的等级，对于这些等级适用至哪个水平，几乎没有一致意见。本文描述的分类中的层次结构反映了人们当前对于单系谱系（即进化枝）是如何相关的理解，如系统发育树所示[1]。进化枝被简单定义为一群被认为从共同祖先进化而来的生物。许多常见的进化枝的名称，如顶复门、内阿米巴科和锥虫科，保留了词尾以便于交流，但它们不再与命名的层次结构描述字符，如目、纲或门相关联。

人们可能会问，如果分类只是组织物种的一种方式，为什么所有关于分类的小问题都有必要认真对待，原因在于存在通过物种谱系遗传的模式。当从其他谱系（系统发育学）推导出正确的谱系序列时，它将反映遗传信息，并将其转化为连续的分类群。当物种被放置在正确的分类位置时，可以从它们在分类中的位置推导出大量的信息，这与周期表中元素的分类相似。这就是如何识别周期（或模式），这样有助于学习和记忆。生物分类中可识别的模式包括与生物的生态功能、代谢途径的生物化学、细胞生物学和细胞膜化学、宿主细胞的穿透，以及逃避宿主免疫反应的能力有关的模式。例如，如果一个物种在分类中被置于不正确的位置，那么群特定的药理学是无效的，只有根据它在分类中的正确位置，才能对它的新陈代谢进行正确的研究。那么，临床微生物学家应该如何使用这个新的系统？尤其是在培养未来一代技师、住院医生和研究员时。通常采用的一项建议是简要讨论组织的最高层次，即超群（supergroup），然后，引用其他进化枝的熟悉名称（例如，顶复门）。保留了最低进化枝的名称，即属名和种名，从而简化了与临床医生和其他微生物学家的沟通。可以用众所周知的引起疟疾的寄生虫来说明这种方法。在大多数情况下，人们可以说这些寄生虫属顶复门进化枝（顶复门寄生虫）、疟原虫属。这基本上是今天所使

用的措辞，但顶复门进化枝不再被称为门。当需要提供全谱系时，目前基于基因分析的理解，从最高（超群）进化枝到最低（物种）进化枝依次列出，中间用冒号分隔（例如，SAR：顶复动物：孢子虫：血液孢子虫：疟原虫）。

一、真核生物的现代分类

真核生物现在被分为 5 个单系谱，称为超群，其中 4 类包含人体寄生虫：SAR、古虫界、阿米巴和后鞭毛生物（图 135-1）。正如上面所讨论，这些超群取代了以前包含了真核生物（植物、动物和真菌）的界。原生生物是真核生物中的进化枝，被定义为单细胞生物而细胞不分化为组织（即所有没有胚胎的真核生物）[1]。根据这个定义，原生生物包括寄生原虫、自由生活的原虫、真菌和大多数藻类。如此，包含多细胞生物的进化枝是动物、植物和棕色巨藻。原生生物细胞分化的发生仅限于具有互补配对类型的性细胞，一个替代的营养形态（如滋养体）和静止的或抵抗不良环境的阶段，如包囊或孢子。通过包囊（有丝分裂和营养生殖）或孢子（减数分裂和有性生殖）进行传播，但传统文献并未一直使用这些术语。原生生物的形态是多种多样的，包括有细胞壁或无细胞壁的，能动的或不能动的。可运动细胞的运动方式有表面滑行、阿米巴样爬行，或通过称为纤毛的运动细胞器（常被错误地称为"鞭毛"）在液体中游动。不幸的是，"鞭毛"一词仍然不加区分地用于原核生物和真核

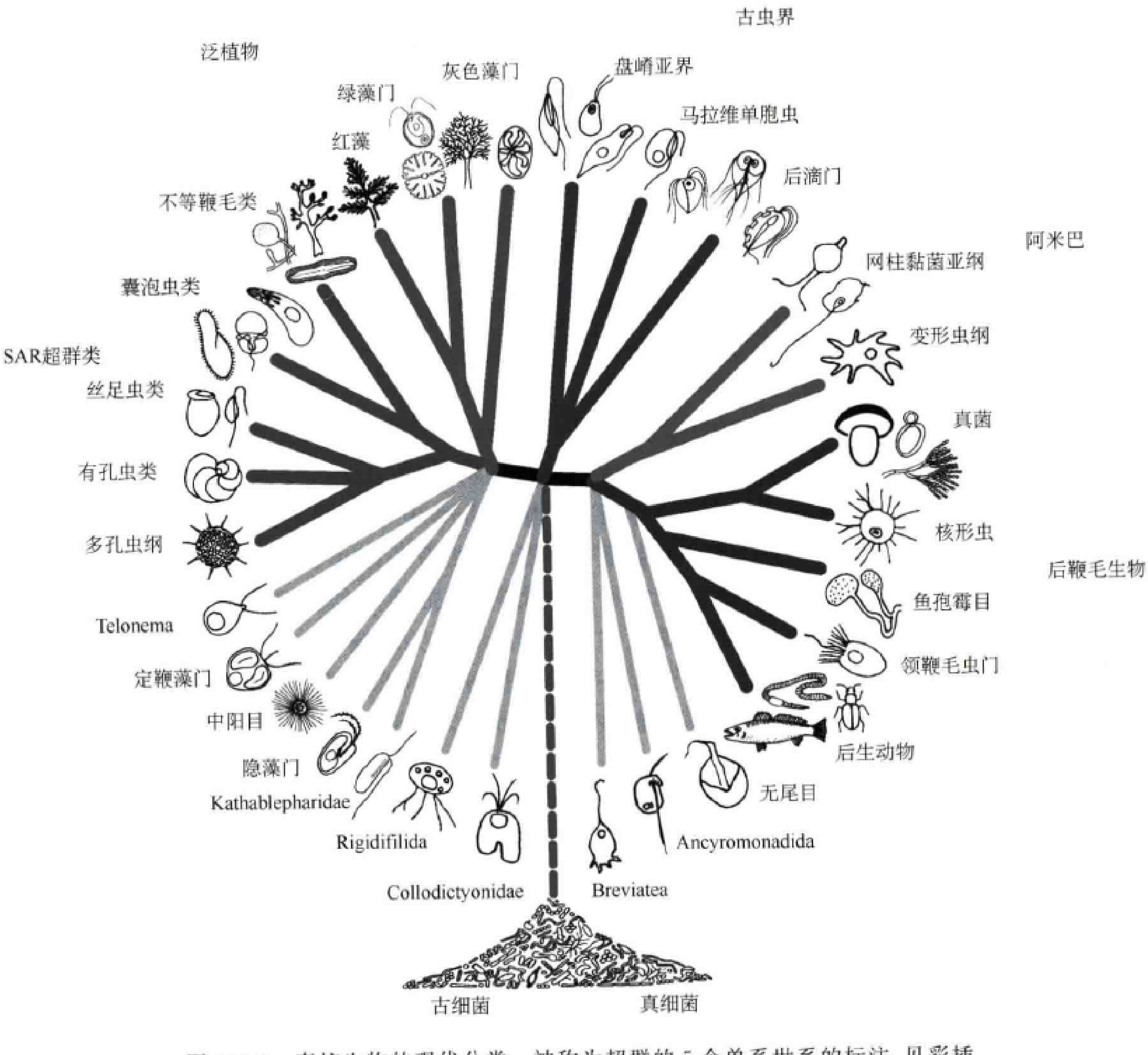


图 135-1 真核生物的现代分类。被称为超群的 5 个单系世系的标注，见彩插

生物的运动细胞器。然而，细菌鞭毛和真核细胞纤毛的分子结构和运动产生的机制是不相关的且不同的。因此，它们对不同的药物敏感。出于本章的意图，笔者使用正确的术语。与细菌鞭毛（组装的鞭毛蛋白单体和一个锚定分子马达）不同，真核生物纤毛由微管蛋白单体组成，结构复杂，具有附加的细胞骨架和调节分子，以及非常复杂的锚结构，包括由不同种类的细胞骨架分子组成的基底体和纤维根，这些分子在形态上是与系统发育相关的并且多种多样。大多数原生生物至少在其生活史的部分阶段中有 1 根或多根纤毛，许多阿米巴和各超群中的某些科没有纤毛（分化中丧失）。阿米巴样运动可见于不同门的生物，而不仅仅是阿米巴。滑行运动发生在有纤毛或没有纤毛的物种中，在许多分类群中都有观察到。

在这里，笔者用熟悉的例子概述了原生生物 5 个超群的组成。对寄生于人体的多细胞蠕虫也进行了描述。后鞭毛生物包括真菌、动物和几个原生生物进化枝，它们是了解动物和真菌代谢起源及动物多细胞性起源的关键。阿米巴主要包括阿米巴样运动的属，但有些在其生活史中包括有纤毛的阶段。这个超群中的重要成员有内阿米巴属、内蜒属、嗜碘阿米巴属、棘阿米巴属、巴拉姆西属和匀变虫属（表 135-1）。阿米巴和后鞭毛生物有一个共同的起源，因其祖先无特定的细胞形状而被称为无定形体（希腊语，“无形态”）。古虫界包括许多寄生谱系，很多是临床微生物学家众所周知的，如贾第虫属、毛滴虫属、锥虫和利什曼属。泛植物包括绿藻和红藻，不含任何人体寄生虫，它们在这里未进一步讨论。

最后，SAR 超群包括 3 种非常不同的单系进化枝，不等鞭毛类（Stramenopiles）、囊泡虫类（Alveolata）和有孔虫界（Rhizaria）（最后一个被划分为丝足虫类、有孔虫类和多孔虫类）。SAR 和泛植物，连同本章中未讨论的其他几个分类群，形成了超群和进化枝的一个单系群，称为 Diaphoretickes（希腊语，“多样化”）。不等鞭毛类包括芽囊原虫属、褐藻和各种植物寄生虫。囊泡虫类包括纤毛虫（如肠袋虫）、甲藻门和顶复亚门（历史上称为孢子虫的寄生虫属）。顶复亚门保留了存在于大部分物种内编码少量基因的残存叶绿体。这种质体来源于绿藻，因此，这些酶与线粒体和真核细胞核基因的酶不同。这种细胞器已成为针对这些基因产物的新药的潜在靶标。重要的顶复亚门寄生虫包括隐孢子虫、弓形虫、环孢子虫、肉孢子虫、巴贝虫和疟原虫。SAR 超群中的最后一个谱系是有孔虫，它不包含任何人体寄生虫。

二、寄生原虫的分类

关于寄生原虫的具体信息可在本书后面章节中找到。本节概述了各进化枝（表 135-1）寄生原虫的基本特征及它们在科和属水平上的分类状况。通过对 18S 小 rRNA 基因区域的测序和系统发育分析进行虫种鉴定，并对照参考序列验证虫种鉴定。

表 135-1 人体寄生原虫[a]

代表生物[b]	前一版中的名称[c]	现代分类	超群
十二指肠贾第虫（*Giardia duodenalis*）；同种异名：小肠贾第虫（*G. intestinalis*），蓝氏贾第虫（*G. lamblia*）[d]	后滴门（Metamonada）；双滴纲（Trepomonadea）；双滴虫目（Diplomonadida）	后滴门（Metamonada）；多鞭毛虫纲（Fornicata）；双滴虫目（Diplomonadida）；贾第虫亚科（Giardiinae）	古虫界（Excavata）
人肠滴虫（*Enteromonas hominis*）	后滴门（Metamonada）；双滴虫目（Diplomonadida）	后滴门（Metamonada）；多鞭毛虫纲（Fornicata）；双滴虫目（Diplomonadida）；六鞭毛虫科（Hexamitinae）	古虫界（Excavata）
迈氏唇鞭毛虫[e]（*Chilomastixe mesnili*），肠旋滴虫[e]（*Retortamonase intestinalis*）	后滴门（Metamonada）；曲滴虫目（Retortamonadida）	后滴门（Metamonada）；多鞭毛虫纲（Fornicata）；曲滴虫目（Retortamonadida）	古虫界（Excavata）

（续 表）

代表生物[b]	前一版中的名称[c]	现代分类	超群
脆弱双核阿米巴（*Dientamoeba fragilis*）	后滴门（Metamonada）；毛滴目（Trichomonadida）	后滴门（Metamonada）；Parabasalia；三毛滴虫属（*Tritrichomonadea*）	古虫界（Excavata）
阴道毛滴虫（*Trichomonas vaginalis*），人四毛滴虫（*T. tenax*），*Tetratrichomonas empyemagena*，人五毛滴虫（*Pentatrichimonas hominis*）	后滴门（Metamonada）；毛滴目（Trichomonadida）	后滴门（Metamonada）；Parabasalia；毛滴纲（Trichomonadea）	古虫界（Excavata）
福勒耐格里阿米巴（*Naegleria fowleri*），其他耐格里属虫种（*Naegleria* spp.）	异叶足纲（Heterolobosea）；裂黄目（Schizopyrenida）	渗养门（Discicristata）；异足虫纲（Heterolobosea）；四鞭毛虫科（Tetramitia）	古虫界（Excavata）
杜氏利什曼原虫（*Leishmania donovani*） 婴儿利什曼原虫（*L. infantum*） 硕大利什曼原虫（*L. major*） 热带利什曼原虫（*L. tropica*） 巴西利什曼原虫（*L. braziliensis*） 墨西哥利什曼原虫（*L. mexicana*） 埃塞俄比亚利什曼原虫（*L. aethiopica*） 阿氏利什曼原虫（*L. archibaldi*） 亚马逊利什曼原虫（*L. amazonensis*） 哥伦比亚利什曼原虫（*L. colombiensis*） 盖氏利什曼原虫（*L. garnhami*） 圭亚那利什曼原虫（*L. guyanensis*） 凯氏利什曼原虫（*L. killicki*） 蓝氏利什曼原虫（*L. lainsoni*） 奈氏利什曼原虫（*L. naiffi*） 巴拿马利什曼原虫（*L. panamensis*） 秘鲁利什曼原虫（*L. peruviana*） 皮华诺利什曼原虫（*L. pifanoi*） 肖氏利什曼原虫（*L. shawi*）	锥虫目（Trypanosomatida）	眼虫门（Discicristata）；动基体纲（Euglenozoa）；锥体目（Kinetoplastea） 锥体科（Trypanosomatida）	古虫界（Excavata）
克氏锥虫（*Trypanosoma cruzi*） **冈比亚布氏锥虫（*T. gambiense*）[f]，罗德西亚布氏锥虫（*T. bruceirhodesiense*）** 让氏锥虫（*T. rangeli*）	锥虫目（Trypanosomatida）	眼虫门（Discicristata）；动基体纲（Euglenozoa）；锥体目（Kinetoplastea） 锥体科（Trypanosomatida）	古虫界（Excavata）
卡斯特拉尼棘阿米巴（*Acanthamoeba castellanii*） 阿斯特罗尼棘阿米巴（*A. astronyxis*） 卡伯德森棘阿米巴（*A. culbertsoni*） 哈氏棘阿米巴（*A. hatchetti*） 希利棘阿米巴（*A. healyi*） 多噬棘阿米巴（*A. polyphaga*） 条脊棘阿米巴（*A. rhysodes*），其他棘阿米巴虫种 **狒狒巴拉姆希阿米巴（*Balamuthia mandrillaris*）** *Sappinia diploidea*	阿米巴纲（Amoebaea）；棘阿米巴目（Acanthopodida） （自由生活和机会致病阿米巴）	Discosea；Longamoebia；Centramoebida	阿米巴（Amoebozoa）

（续　表）

代表生物[b]	前一版中的名称[c]	现代分类	超群
溶组织内阿米巴(*Entamoeba histolytica*) **结肠内阿米巴(*E. coli*)** **迪斯帕内阿米巴(*E. dispar*)** **哈氏内阿米巴(*E. hartmanni*)** *E. bangladeshi* 诺氏内阿米巴(*E. nuttalli*) 牙龈内阿米巴(*E. gingivalis*) 莫氏内阿米巴(*E. moshkovskii*) 夏氏内阿米巴[g](*E. chattoni*) 波列基内阿米巴[g](*E. polecki*) 微小内蜒阿米巴(*Endolimax nana*) 布氏嗜碘阿米巴(*Iodamoeba bütschlii*)	原阿米巴纲(Archamoebae)：Euamoebida	原阿米巴纲(Archamoebae)：Euamoebida	阿米巴(Amoebozoa)
微小隐孢子虫(*Cryptosporidium parvum*) 贝氏隐孢子虫(*C. bailey*) 犬隐孢子虫(*C. canis*) 猫隐孢子虫(*C. felis*) **人隐孢子虫(*C. hominis*)** 火鸡隐孢子虫(*C. meleagridis*)，其他虫种	顶复门(Apicomplexa)：球虫纲(Coccidea) 艾美球虫目(Eimeriida)	顶复门(Apicomplexa)： 类锥体纲(Conoidasida)： 隐孢子虫(*Cryptosporidium*)	SAR 超群
刚地弓形虫(*Toxoplasma gondii*) **卡耶塔环孢子虫(*Cyclospora cayetanensis*)** 贝氏囊等孢子虫(*Cystoisopora belli*)(以前为等孢球虫(*Isospora belli*)) 人肉孢子虫(*Sarcocystis hominis*) 猪-人肉孢子虫(*Sarcocystis suihominis*)	顶复门(Apicomplexa)：球虫纲(Coccidea) 艾美球虫目(Eimeriida)	顶复门(Apicomplexa)：类锥体纲(Conoidasida)：球虫亚纲(Coccidia)： 艾美尔亚目(Eimeriorina)	SAR 超群
田鼠巴贝虫(*Babesia microti*) 邓肯巴贝虫(*B. duncani*) 分歧巴贝虫(*B. divergens*) 吉氏巴贝虫(*B. gibsoni*)，其他巴贝属虫种 **泰勒属(*Theileria* spp.)**	顶复门(Apicomplexa)：球虫纲(Coccidea) 梨浆虫目(Piroplasmida)	顶复门(Apicomplexa)：无类锥体纲(Aconoidasida)：梨形目(Piroplasmorida)	SAR 超群
诺氏疟原虫(*Plasmodium knowlesi*) 食蟹猴疟原虫(*P. cynomolgi*) **恶性疟原虫(*P. falciparum*)** **三日疟原虫(*P. malariae*)** **卵形疟原虫(*P. ovale*)** **间日疟原虫(*P. vivax*)**	顶复门(Apicomplexa)：球虫纲(Coccidea) 血孢子虫目(Haemosporida)	顶复门(Apicomplexa)：无类锥体纲(Aconoidasida)：血孢子虫(*Haemospororida*)	SAR 超群
***Neobalantidium coli*(之前为结肠小袋纤毛虫(*Balantidium coli*)**	纤毛亚门(Ciliophora)：Trichostomatia 目	纤毛亚门(Ciliophora)：直口纲(Litostomatea;)：毛口目(Trichostomatia)	SAR 超群
芽囊原虫属(*Blastocystis*spp.) (不再推荐临床报告人芽囊原虫(*Blastocystis hominis*)	芽囊原虫纲(Blastocystea)	不等鞭毛类(Stramenopiles)： 芽囊原虫(*Blastocystis*)	SAR 超群

注：[a]原生生物分类的更新请见 Adl 等的文献[25]。[b]黑体表示最常见的病原体。[c]以前使用的分类等级门、纲、目分别以 P、C、O 表示，这些等级在现代分类系统中不再使用，在本手册上一版本中它们是被武断指定的。[d]贾第虫形态类型最可能是 2 个同形种。[e]系统发育研究揭示，根据形态学唇鞭毛虫和旋滴虫经常被混淆或误认。[f]布氏锥虫的 2 个亚种是冈比亚布氏锥虫和哥伦比亚布氏锥虫，但有时候文献将它们列为冈比亚锥虫和哥伦比亚锥虫。[g]夏氏内阿米巴是波列基内阿米巴的一个变种

(一)贾第虫属、肠滴虫属、唇鞭毛虫属、曲滴虫属、双核阿米巴属、毛滴虫属和五鞭毛虫属

贾第虫属、肠滴虫属、唇鞭毛虫属、曲滴虫属、双核阿米巴属、毛滴虫属和五鞭毛虫属属于古虫界超群[2],厌氧或微需氧,线粒体减少,没有染色体,不能呼吸。根据其保留的功能,这些减少的线粒体称为氢化酶体和纺锤剩体。除非另有说明,所有的摄食均通过胞饮进行。除阴道毛滴虫(一种泌尿生殖道寄生虫)和口腔毛滴虫(一种口腔寄生虫)外,均可致肠道感染。贾第虫(后滴门:多鞭毛虫纲:双体目:贾第虫科)有一对细胞核和4根纤毛,虫体看起来是4个半边镜像体。贾第虫是许多哺乳动物和鸟类的专性肠道寄生虫。肠滴虫(双体目:Hexamitinae)已失去镜像排列,留有1个细胞核和2根纤毛,其谷氨酰胺(TAR)使用不同的密码子,它有一个摄食槽(胞口)。唇鞭毛虫和曲滴虫是肠道寄生虫,曲滴虫目除了一种已知的自生生活的虫种外,其余均为肠道寄生虫。这2个属可通过具有4根纤毛(唇鞭毛虫属)或是2根纤毛(曲滴虫属)在形态上进行区分。然而,系统发育研究并不支持这个群体为单系,因此,它们被认为是独立的谱系。

双核阿米巴属、毛滴虫属和五鞭毛虫属在古虫界超群中属于副基体门。它们具有氢化酶体和连接纤毛基底体和高尔基体的细胞骨架元件(副基体)。还有另外的复杂细胞骨架结构以促进其在黏性流体中的滑动。双核阿米巴(副基体门:Tritrichomonadea)滋养体没有纤毛,有2个核,不形成包囊。毛滴虫和五鞭毛虫(副基体门:Tritrichomonadea)也不形成包囊。五鞭毛虫有6根纤毛,通过肠液的胞饮作用和细菌的吞噬作用而摄食。毛滴虫是人体最常见的性传播原虫之一。最近,有描述副基体门的一些种可引起人体呼吸道感染。

(二)耐格里属、利什曼属和锥虫属

耐格里属、利什曼属和锥虫属属于古虫界中一个称为Discicristata的进化枝[2]。除了细胞骨架排列上的许多共性(衍征)外,它们还具有扁平或盘状嵴的线粒体。

耐格里阿米巴(异叶足纲:Tetramedia)有2种运动形态,一种是阿米巴样滋养体,另一种形态有散布的纤毛。虽然这2种形态都具有胞饮能力,但只有阿米巴型才能吞噬细菌。它是一种以细菌为食的自由生活阿米巴,通常见于土壤,或在淡水沉积物和搅动重悬沉积物中成囊。福氏耐格里阿米巴的一些株是机会致病寄生虫,可引起原发性阿米巴脑膜脑炎。

利什曼原虫和锥虫(眼虫门:动基体进化枝)都有一根纤毛,从具有胞饮作用的管状摄食结构(胞口)中产生。它们的分类学最近被修订[4]。线粒体具有由多拷贝如同链锁(连环的)一样缠绕的环形染色体组成的独特DNA,有大环和微环2种类型。大环是线粒体环形染色体的连环重复拷贝,有几十个,每个大小为20~40 kb。微环的大小为0.5~1.0 kb,数以千计,编码向导RNA。来自大环的线粒体前mRNA需要对遗传密码进行大量的编辑,然后才能有效地将mRNA翻译成蛋白质。通过来自微环的向导RNA插入或删除尿苷进行编辑。眼虫门线粒体RNA编辑非常复杂令人费解。

锥虫感染脊椎动物宿主,由吸血昆虫(噬血昆虫)传播(很少有例外)。锥虫被细分为9个进化枝(不再分亚属)。锥虫亚属进化枝有3个种,即布氏锥虫、伊氏锥虫和马媾疫锥虫。然而,新的结果显示后两者是布氏锥虫的株或亚种(故不需要有亚属)。布氏锥虫复合体的虫种导致人的昏睡病,通过采采蝇(舌蝇)的唾腺进行传播。病原体为冈比亚布氏锥虫和罗德西亚布氏锥虫。克氏锥虫导致恰加斯病,由锥猎蝽亚科的昆虫(猎蝽)传播。宿主皮肤上的昆虫粪便含有能穿过宿主组织的感染性虫体。克氏锥虫可基于线粒体或核基因的系统发育分析进一步细分为不同的群。最近的研究倾向于接受3个克氏锥虫种群,而不是7个。

利什曼原虫感染脊椎动物宿主,最常见的是犬科、蹄兔科(4种已知物种)、啮齿目和人类。它们是由旧世界至少93种白蛉(白蛉属)和美洲至少33种白蛉(罗蛉属)传播的。两类白蛉均吸血,属双翅目(毛蛉科:白蛉亚科)。只有雌性白蛉叮咬宿主吸血。一些种类的白蛉对吸血对象的选择更有针对性,另一些则不那么挑剔。利什曼原虫约有53种,约20种感染人类。具有感染性的前鞭毛体有一根纤毛,前鞭毛体见于白蛉的肠道。无鞭毛体(无纤毛)为胞内寄生虫,寄生于血液单核巨噬细胞,存在于循环系统。

(三)棘阿米巴属、巴拉姆西阿米巴属、内阿米巴属、内蜒阿米巴属和嗜碘阿米巴属

棘阿米巴、巴拉姆西阿米巴、内阿米巴、内蜒阿米巴和嗜碘阿米巴这类阿米巴样原生生物属于阿米巴超群[2]。棘阿米巴和巴拉姆西阿米巴(Discosea: Longamoebia: Centramoebida)扁平,可延长,具有伪足和特征性的副伪足。它们在土壤中通过吞噬细菌为食,可形成具有抵抗力的包囊,包囊为静止期,是传播阶段。这两属均有一些虫种为人体机会致病寄生虫,导致肉芽肿性阿米巴脑炎。内阿米巴属(Archamoebae: 内阿米巴科)可通过分子系统发育研究细分为几个进化枝。在动物口腔和肠道样本中发现的虫种,有极少数分离株为自由生活。细胞器很少(虫体没有纤毛、中心粒或过氧化物酶),特别是线粒体弱化成了对呼吸或能量产生无用的非编码的纺锤剩体。内膜和分泌膜大大减少。这些虫种通过吞噬作用以肠道细菌为食。在粪便中形成包囊进行传播。内蜒阿米巴和嗜碘阿米巴与内阿米巴科相关,同样具有弱化的非需氧线粒体,由包囊扩散。在各种动物的肠道中已经发现了内蜒阿米巴属,通过吞噬细菌为食,在人体标本中发现有一个虫种即微小内蜒阿米巴。布氏嗜碘阿米巴出现在人的肠道中,通过吞噬作用以细菌和酵母菌为食。

(四)巴贝虫属、疟原虫属、隐孢子虫属、环孢子虫属、囊等孢虫属、肉孢子虫属和弓形虫属

巴贝虫属、疟原虫属、隐孢子虫属、环孢子虫属、囊等孢虫属、肉孢子虫属和弓形虫属属于SAR超群的顶复亚门(囊泡虫:顶复亚门)进化枝[2]。顶复门是脊椎和无脊椎动物寄生虫及少数原生生物如纤毛虫和有孔虫属的一个谱系[5]。主要特征是至少在生活史中的一个阶段在细胞膜附近有扁平的小囊泡,以及用于穿过宿主细胞的顶端复合体。通常通过滑动和身体收缩进行运动,通过胞饮作用摄取营养。

孢子虫(巴贝虫和疟原虫)的无性活动阶段缺乏顶端复合体的锥状体。血孢子虫活动的二倍体合子(动合子)保留有锥状体。大配子和小配子是在多宿主生活史中独立形成的。疟原虫(孢子虫:血孢子虫)是疟疾的病原体,需要一个脊椎动物宿主和一个昆虫媒介。通过裂殖生殖进行无性繁殖。动合子保留锥状体。小配子通过一根纤毛运动,卵囊的核分裂形成子孢子。巴贝虫(孢子虫:Piroplatmorida)是脊椎动物的溶血性血液寄生虫,有些种类感染人体。没有锥状体和纤毛,但有顶端复合体的极环。Piroplasmorida没有卵囊期,有性状态可能与大伪足样延伸有关(称为Strahlen)。

类锥体纲(隐孢子虫、环孢子虫、囊等孢虫、肉孢子虫和弓形虫)在所有或大多数无性繁殖阶段均具有包括锥状体在内的顶端复合体。细胞通过滑动、膜嵴的弯曲或起伏而移动,小配子可通过纤毛运动。类锥体纲的分类仍在不停的变化中,但至少3个进化枝被接受:球虫、簇虫和隐孢子虫。隐孢子虫属的虫种导致许多哺乳动物呼吸道和肠道感染。卵囊有营养器附件。卵囊无孢子囊,形成4个裸露的子孢子,小配子无纤毛。在一个宿主中完成生活史,包囊通过粪便排出。通常,摄入的卵囊在十二指肠脱囊。第二种传播方式是吸入受污染物。其余属(环孢子虫属、囊等孢虫属、肉孢子虫属和弓形虫属)属于艾美耳亚目(类锥体纲:球虫:艾美尔亚目)的球虫。它们的特点是有一个很少活动的合子,配子成熟发生在细胞内,一个小配子母细胞释放许多带有纤毛的小配子,卵囊形成一个孢子囊释放出子孢子,未见2个虫体融合。卡耶塔环孢子虫感染人体,其他种类已知可感染灵长类动物。已在哺乳动物中发现了囊等孢虫。肉孢子虫也感染爬行动物和鸟类,但主要感染哺乳动物。3个属均引起宿主的肠道感染。弓形虫是所有温血动物的一种专性胞内寄生虫,感染宿主组织,猫科动物(猫)是终末宿主,在其体内发生有性生殖。

(五)*Neobalantidium*

Neobalantidium 以前称为小袋虫属,属于SAR超群[6]囊泡虫中的纤毛亚门进化枝。在一些哺乳动物中发现了 *Neobalantidium*,它是肠道共生的,通常不致病且无症状。它在排出的粪便中形成包囊,通常通过粪-口途径传播。脱囊发生在肠道,滋养体通过吞噬作用在肠道摄入细菌。小袋结肠纤毛虫(纤毛门:侧口纲:毛口目)是唯一寄生于人体的纤毛虫(即,纤毛亚门)。毛口目的所有属通常为脊椎动物的内共生体。它们具有侧口纲特有的纤毛。

(六)芽囊原虫属

芽囊原虫属属于SAR超群中的不等鞭毛类。不等鞭毛类只有芽囊原虫一个属，没有进一步的分类，是许多脊椎动物(甚至全部)和一些无脊椎动物肠道厌氧共生体或寄生虫[7]。细胞缺乏形态特点，表现为酵母样，尽管观察到轻微阿米巴样的形态。残余的线粒体保留了少量的基因，其代谢得到了相当大的关注。滋养体以肠液为食，也有包囊。不同的种对宿主来说是非特异性的，感染可以包括几个基因变种。因此，由宿主类型命名芽囊原虫的惯例没有得到系统发育研究的支持。由于这个原因，物种种名部分的“人”不再被认为是有效的，而是通过18S rRNA基因的DNA序列来识别它所属的进化枝。虽然研究人员倾向于以基于序列数据的芽囊原虫基因型或亚型作为参考，但光镜下无法通过形态观察区分这些基因型，因此，临床微生物学家在粪便寄生虫检查报告上只需报告“芽囊原虫”。

三、寄生蠕虫和节肢动物的分类

在后鞭毛生物超群中，这些动物属于动物总界(动物总界：后生动物：动物)。动物总界包括几个原生生物进化枝及后生动物。后生动物包括海绵和动物类。在动物类中，寄生于人体的物种出现在两侧对称动物类(具有双侧体对称和3个基本胚层的动物)。在两侧对称动物类中，它们属于原口动物(在胚胎原肠胚形成时，胚孔变成口孔)。原口动物基本上被划分为3个进化枝(表135-2)。其中一支包括箭虫(毛颚动物)，此处不加以讨论。另一分支包括节肢动物、线虫、鳃曳动物和其他世系，并命名为蜕皮动物(通过蜕皮成长并具有管状消化道)。最后一支包括软体动物、环节动物、扁形动物(包括绦虫和吸虫)及命名为螺旋卵裂动物分支(在早期胚胎形成时细胞发生螺旋卵裂)中的其他世系。在螺旋卵裂动物中，人们所关注的人体寄生虫位于冠轮动物(其幼虫阶段，至少在祖先，在口孔的周围有一簇带有纤毛的触须)。部分学者不当地使用了冠轮动物这个词来指所有的螺旋卵裂动物。下面讨论的5组寄生虫属于原口动物。棘头虫、吸虫和绦虫属于冠轮动物，线虫和节肢动物属于蜕皮动物。

(一)棘头虫

棘头虫是由自由生活的轮虫进化而来的体内寄生蠕虫，它们一起被置于轮毛动物门(扁形动物门：轮毛动物门：棘头纲)[8]中。棘头虫进一步细分为3个进化枝：原棘头虫、黎明棘头虫和古棘头虫[9]。成虫有刺的吻用于附着在终末宿主的肠壁上，通过粪便中的卵进行传播。中间宿主通常是节肢动物，而确切的宿主是颚口类(有颌脊椎动物)、辐鳍鱼(鳍刺类鱼)、两栖动物和哺乳动物，包括家畜和人类。已有描述的物种有大约1100种，但许多其他种类存在于尚未研究的宿主中。人类感染并不常见，念珠棘头虫(原棘头虫：念珠棘头虫)是临床实验室中最常见的一种。然而，另有6种与人类感染有关联[10-11]，其中包括猪巨吻棘头虫、大巨吻棘头虫、蟾蜍伪棘头虫、瘤棒体棘头虫、斜吻棘头虫和球茎体虫。

表135-2 与人体寄生虫相关的原口动物(动物界：两侧对称动物)的分类

分类	成员
毛颚动物门(Chaetognatha)	箭虫(Arrow worms)(没有已知的人体寄生虫)
蜕皮动物总门(Ecdysozoa)	节肢动物门(Arthropoda)，线虫门(Nematoda)，鳃曳动物门(Priapulida)和其他
螺旋卵裂动物(Spiralia)：冠轮动物总门(Lophotrochozoa)	棘头动物门(Acanthocephala)，绦虫纲(Cestoda)，吸虫纲(Trematoda)

(二)吸虫

吸虫(扁形动物门：Neodermata亚门：吸虫纲)有2个亚纲，均为专性寄生虫[12]。盾腹目感染软体动物，复殖目(俗称吸虫)是软体动物和脊椎动物的寄生虫。它们的特点是合胞被膜和2个吸盘，一个腹吸盘和一个口吸盘。已确认约80个科，迄今描述约有6000种，有13种以各不相同的频率感染人体(表135-3)，影响超过2.5亿人。称为组织吸虫的几个属可引起食源性感染，而血吸

虫感染来自钉螺宿主，通过接触疫水而感染，寄生虫侵入人体并入血，因此，它们被称为血吸虫。与其他雌雄同体的吸虫不同的是，血吸虫是雌雄异体，分为雌虫和雄虫。

表 135-3　吸虫纲(动物界:螺旋卵裂动物:冠轮动物:扁形动物门:Neodermata:吸虫纲:复殖亚纲

种[a]	前一版分类	现代分类(目和科)
曼氏血吸虫(*Schistosoma mansoni*)	双穴目(Diplostomida):裂体科(Schistosomatidae)	鸮形目(Strigeatida):裂体科(Schistosomatidae)
S. guineensis		
埃及血吸虫(*S. haematobium*)		
日本血吸虫(*S. japonicum*)		
间插血吸虫(*S. intercalatum*)		
湄公血吸虫(*S. mekongi*)		
牛血吸虫(*S. bovis*)		
马来血吸虫(*S. malayensis*)		
麦氏血吸虫(*S. mattheei*)		
裂体吸虫(*Schistosoma* spp.)		
特瑞哥澳毕吸虫(*Austrobilharzia terrigalensis*)		
波兰小毕吸虫(*Bilharziella polonica*)		
椋鸟巨毕吸虫(*Gigantobilharzia sturniae*)		
赫氏巨毕吸虫(*G. huttoni*)		
美洲异毕吸虫(*Heterobilharzia americana*)		
瓦格拉蒂微毕吸虫(*Microbilharzia variglandis*)		
土耳其斯坦东毕吸虫(*Orientobilharzia turkestanicum*)		
毛毕吸虫(*Trichobilharzia* spp.)		
平坦弯口吸虫(*Clinostomum complanatum*)	双穴目(Diplostomida):弯口科(Clinostomidae)	双穴目(Diplostomida):弯口科(Clinostomidae)
有翼翼形吸虫(*Alaria alata*)	双穴目(Diplostomida):双穴科(Diplostomatidae)	鸮形目(Strigeatida):双穴科(Diplostomatidae)
美洲重翼吸虫(*A. americana*)		
匙形复口吸虫(*Diplostomum spathaceum*)		
汉城新复口吸虫(*Neodiplostomum seoulensis*)		
嗜眼吸虫(*Philophthalmus* spp.)		棘口目(Echinostomida):嗜眼科(Philophthalmidae)
人似腹盘吸虫(*Gastrodiscoides hominis*)	斜睾目(Plagiorchiida):合叶科(Zygocotylidae)	棘口目(Echinostomida):同端吸盘科(Paramphistomidae)
瓦氏瓦生吸虫(*Watsonius watsoni*)		
圆圃棘口吸虫(*Echinostoma hortense*)	斜睾目(Plagiorchiida):棘口科(Echinostomatidae)	棘口目(Echinostomida):棘口科(Echinostomatidae)
多刺棘口吸虫(*E. echinatum*)		
巨睾棘口吸虫(*E. macrorchis*)		
棘卷口吸虫(*E. revolutum*)		
伊族棘口吸虫(*E. ilocanum*)		
抱茎棘隙吸虫(*E. perfoliatum*)		
Acanthoparyphium kurogamo		
台森刺缘吸虫(*A. tyosenense*)		
马来亚刺口吸虫(*Artyfechinostomum malayanum*)		
曲领棘缘吸虫(*Echinoparyphium recurvatum*)		
棘隙吸虫(*Echinochasmus* spp.)		
锥状低颈吸虫(*Hypoderaeum conoideum*)		

（续 表）

种[a]	前一版分类	现代分类(目和科)
肝片形吸虫(*Fasciola hepatica*) 巨片形吸虫(*Fasciola gigantica*)， **布氏姜片吸虫(*Fasciola buski*)**	斜睾目(Plagiorchiida)：片形科(Fasciolidae)	棘口目(Echinostomida)：片形科(Fasciolidae)
齿形背茎吸虫(*Apophallus donicus*) 尖端棘带吸虫(*Centrocestus cuspidatus*) 台湾棘带吸虫(*C. formosanus*) 舌隐叶吸虫(*Cryptocotyle lingua*) 单睾吸虫(*Haplorchis* spp.) 异形异形吸虫(*Heterophyes heterophyes*) 异形吸虫(*Heterophyes* spp.) 横川后殖吸虫(*Metagonimus yokogawai*) 高桥后殖吸虫(*M. takahashii*) 宫田氏后殖吸虫(*M. miyatai*) 前肠异形吸虫(*Pygidiopsis summa*) 镰刀星隙吸虫(*Stellantchasmus falcatus*) 斑皮吸虫(*Stichodora* spp.)	斜睾目(Plagiorchiida)：异形科(Heterophyidae)	后睾目(Opisthorchiida)：异形科(Heterophyidae)
华支睾吸虫(*Clonorchis sinensis*) **猫后睾吸虫(*Opisthorchis felineus*)** **麝猫后睾吸虫(*O. viverrini*)**	斜睾目(Plagiorchiida)：后睾科(Opisthorchidae)	后睾目(Opisthorchiida)：后睾科(Opisthorchiidae)
彭氏显茎吸虫(*Phaneropsolus bonnie*) 刺茎显茎吸虫(*P. spinicirrus*) 莫氏显茎吸虫(*P. molenkampi*)	斜睾目(Plagiorchiida)：枝腺科(Lecithodendriidae)	斜睾目(Plagiorchiida)：枝腺科(Lecithodendriidae)
卫氏并殖吸虫(*Paragonimus westermani*) **异盘并殖吸虫(*P. heterotremus*)** **克氏并殖吸虫(*P. kellicotti*)** 双侧宫并殖吸虫(*P. uterobilateralis*) 非洲并殖吸虫(*P. africanus*) 墨西哥并殖吸虫复合群(*P. mexicanus* complex) 宫崎并殖吸虫(*P. miyazakii*) 大平并殖吸虫(*P. ohirai*) 肺生并殖吸虫(*P. pulmonalis*) 斯氏并殖吸虫(*P. skrjabini*)	斜睾目(Plagiorchiida)：并殖科(Paragonimidae)	斜睾目(Plagiorchiida)：隐孔科(Troglotrematidae)
支双腔吸虫(*Dicrocoelium dendriticum*) 胰阔盘吸虫(*Eurytrema pancreaticum*)	斜睾目(Plagiorchiida)：双腔科(Dicrocoeliidae)	斜睾目(Plagiorchiida)：双腔科(Dicrocoeliidae)
斜睾吸虫属(*Plagiorchis* spp.)	斜睾目(Plagiorchiida)：斜睾科(Plagiorchiidae)	斜睾目(Plagiorchiida)：斜睾科(Plagiorchiidae)
鲑侏形吸虫(*Nanophyetus salmincola*)	斜睾目(Plagiorchiida)：隐孔科(Troglotrematiidae)	斜睾目(Plagiorchiida)：隐孔科(Troglotrematiidae)
繁睾吸虫(*Achillurbainia* spp.)	斜睾目(Plagiorchiida)：繁睾科(Achillurbainiidae)	斜睾目(Plagiorchiida)：繁睾科(Achillurbainiidae)

注：[a] 黑体为更重要的虫种，细体为不常见虫种

(三)绦虫

通常被称为绦虫的所有的多节绦虫(扁形动物门：Neodermata 亚门：绦虫纲)都是专性肠道寄生虫。通过分子系统发育分析至少可区分 19 个目[13-15]，但随着研究的不断深入，属的单系排列仍在不断变化。已知的虫种有 7000 多种，但许多其他虫种存在于各种动物中。有 2 个目包含感染人类的虫种(表 135-4)。假叶目绦虫成虫有多个节片和 2 个吸槽。节片腹面中部具有特征性的生殖和子宫孔，具有分为两叶的卵巢和典型的虫卵形态。裂头科绦虫包括寄生于人体的虫种，人可以

作为终末宿主(双头绦虫属、裂头属和腺头虫)或偶然宿主(迭宫绦虫属),由于它是复系,故其分类还在不断更新中。哺乳动物为终末宿主,以桡足动物或桡足动物和鱼类作为中间宿主。第二个目,圆叶目,有15个科,至少有3100种已知虫种。该目包含带科绦虫,该科包含了在医学上重要的属,如带绦虫属和棘球属。圆叶目还有另外5个重要的科(表135-4)。它们的特征是具有多个节片、头节上有4个吸盘用于附着宿主、一侧有一个生殖孔(除了双壳科,其两侧都有生殖孔),并在卵巢后有致密的卵黄腺。

表 135-4 绦虫纲(动物界:螺旋卵裂动物:冠轮动物:扁形动物门:Neodermata:绦虫纲)

虫种[a]	分类(目和科)
阔节裂头绦虫(*Dibothriocephalus latus*)	假叶目(Pseudophyllidea):裂头科(Diphyllobothriidae)[26]
日本海裂头绦虫(*D. nihonkaiensis*)	
枝形裂头绦虫(*D. dendriticus*)	
达林裂头绦虫(*D. dalliae*)	
Adenocephalus pacificus	
环头裂头绦虫(*Diphyllobothrium stemmacephalum*)	
鲸复殖孔绦虫(*D. Balaennopterae*)	
细尖伯特绦虫(*Bertiella mucronata*)	圆叶目(Cyclophyllidea):裸头科(Anoplocephalidae)
司氏伯特绦虫(*B. studeri*)	
古巴光头绦虫(*Inermicapsifer cubensis*)	
马岛光头绦虫(*I. madagascariensis*)	
对称马带绦虫(*Mathevotaenia symmetrica*)	
吼猴瑞列绦虫(*Buginetta alouattae*)	圆叶目(Cyclophyllidea):戴文科(Davaineidae)
西里伯瑞列绦虫(*Raillietina celebensis*)	
德墨拉瑞列绦虫(*R. demerariensis*)	
犬复孔绦虫(*Dipylidium caninum*)	圆叶目(Cyclophyllidea):复孔科(Dipylidiidae)
微小膜壳绦虫(*Hymenolepis nana*)	圆叶目(Cyclophyllidea):膜壳科(Hymenolepididae)
缩小膜壳绦虫(*Hymenolepis diminuta*)	
变异中殖孔绦虫(*Mesocestoides variabilis*)	圆叶目(Cyclophyllidea):中殖孔科(Mesocestoidae)
线中殖孔绦虫(*M. lineatus*)	
肥胖带绦虫(*Taenia saginata*)	圆叶目(Cyclophyllidea):带绦虫科(Taeniidae)
链状带绦虫(*T. solium*)	
亚洲带绦虫(*T. asiatica*)	
链形多头绦虫(*T. serialis*)	
多头多头绦虫(*T. multiceps*)	
细粒棘球绦虫(*Echinococcus granulosus*)	
多房棘球绦虫(*E. multilocularis*)	
福氏棘球绦虫(*E. vogeli*)	
少节棘球绦虫(*E. oligarthrus*)	
E. canadensis,奥氏棘球绦虫(*E. ortleppi*)	

[a] 黑体为更重要的虫种,细体为不常见虫种

(四)线虫

线虫属于蜕皮动物,是与冠轮动物相邻的进化枝。已描述的至少有20 000种,但大多数看法是预计约有100万种存在。它们如此丰富的多样性是由于它们出现在地球上所有的栖息地,从深海到山顶,跨越所有纬度。它们分为5个进化枝(标记为Ⅰ～Ⅴ),每个分支都具有一个名称[16-19]。进化枝Ⅲ～Ⅴ及其相关世系分为一组,归于称为色矛亚纲的亲本分支。由于研究尚未完成,线虫目和科的系统发生仍在更新中,特别是对于色矛亚纲和进化枝Ⅲ。脊椎动物寄生虫至少有4次独

立的起源。它们见于:①旋毛虫和膨结虫(矛线亚纲,进化枝Ⅰ);②进化枝Ⅲ的所有6组(旋尾亚目,进化枝Ⅲ),即蛔形下目、旋尾下目、Rhigonematomorpha、尖尾下目、颚口下目和龙线总科;③全凹下目(垫刃亚目,进化枝Ⅳ);④小杆下目(小杆亚目,进化枝Ⅴ)。刺嘴亚纲(进化枝Ⅱ)或色矛亚纲内的其他世系均无已知虫种。只有约16种以不同频率感染人体(表135-5)。

表135-5 线虫纲(动物界:蜕皮动物总门:线虫纲)

虫种[a]	分类[目(亚目)[b]:科]
进化枝Ⅰ:矛线亚纲(Dorylaimia)	
菲律宾毛细线虫(*Capillaria philippinensis*)	毛首目(Trichocephalida):毛细线虫科(Capillariidae)
肝毛细线虫(*C. hepatica*)	
嗜气毛细线虫(*C. aerophila*)	
旋毛形线虫(*Trichinella spiralis*)	毛首目(Trichocephalida):毛线虫科(Trichinellidae)
伪旋毛虫(*T. pseudospiralis*)	
乡土旋毛虫(*T. nativa*)	
纳氏旋毛虫(*T. nelsoni*)	
布氏旋毛虫(*T. britovi*)	
巴布亚旋毛虫(*T. papuae*)	
旋毛虫属(*Trichinella* spp.)	
类毛体线虫属(*Anatrichosoma* spp.)	毛首目(Trichocephalida):毛体科(Trichosomoididae)
毛首鞭形线虫(*Trichuris trichiura*)	毛首目(Trichocephalida):鞭尾总科(Trichuroidea)
肾膨结线虫(*Dioctophyme renale*)	膨结虫亚目(Dioctophymatida):膨结线虫科(Dioctophymatidae)
真圆线虫属(*Eustrongylides* spp.)	
错综锥形线虫(*Haycocknema perplexum*)	Muspiceida: Robertdollfusidae
进化枝Ⅲ:色矛亚纲(Chromadoria):Spururina	
似蚓蛔线虫(*Ascaris lumbricoides*)(同种异名:猪蛔虫)(syn. *A. suum*)	蛔目(Ascaridida):蛔科(Ascarididae)
浣熊拜林蛔线虫(*Bayliascaris procyonis*)	
小兔唇蛔线虫(*Lagochilascaris minor*)	
简单异尖线虫(*Anisakis simplex*)	蛔目(Ascaridida):异尖线虫科(Anisakidae)
异尖线虫属(*Anisakis* spp.)	
迷惑伪新地线虫(*Pseudoterranova decepiens*)	
伪新地线虫属(*Pseudoterranova* spp.)	
对盲囊线虫属(*Contracaecum* spp.)	
猫弓首线虫(*Toxocara cati*)	蛔目(Ascaridida):弓首科(Toxocaridae)
犬弓首蛔虫(*T. canis*)	
狮弓蛔虫(*Toxascaris leonina*)	
蠕形住肠线虫(*Enterobius vermicularis*)	尖尾目(Oxyurida):尖尾科(Oxyuridae)
麦地那龙线虫(*Dracunculus medinensis*)	驼形目(Camallanida):龙线科(Dracunculidae)
马来布鲁线虫(*Brugia malayi*)	旋尾目(Spirurida):盘尾科(Onchocercidae)
帝汶布鲁线虫(*B. timori*)	
布鲁线虫属(*Brugia* spp.)	
犬恶丝虫(*Dirofilaria immitis*)	
匍行恶丝虫(*D. repens*)	
细薄恶丝虫(*D. tenuis*)	
厄氏恶丝虫(*D. ursi*)	
常规曼森线虫(*Mansonella perstans*)	
欧氏曼森线虫(*M. ozzardi*)	
链尾曼森线虫(*M. streptocerca*)	
旋盘尾线虫(*Onchocerca volvulus*)	
狼尾旋线虫(*O. lupi*)	
班氏吴策线虫(*Wuchereria bancrofti*)	

（续 表）

虫种[a]	分类［目（亚目）[b]；科］
刚刺颚口线虫（*Gnathostoma hispidum*） 棘颚口线虫（*G. spinigerum*）	旋尾目（Spirurida）；颚口线虫科（Gnathostomatidae）
结膜吸吮线虫（*Thelazia callipaeda*） 加利福尼亚吸吮线虫（*T. californiensis*） 大口吸吮线虫（*T. gulosa*）	旋尾目（Spirurida）；吸吮线虫科（Thelaziidae）
泡翼线虫属（*Physaloptera* spp.）	旋尾目（Spirurida）；泡翼线虫科（Physalopteridae）
美丽筒线虫（*Gongylonema pulchrum*）	旋尾目（Spirurida）；筒线虫科（Gongylonematidae）
进化枝Ⅴ：色矛亚纲（Chromadoria）：小杆亚目（Rhabditina）	
齿龈旋头叶虫（*Halicephalobus gingivalis*） 三等齿属（*Pelodera* spp.）	小杆目（Rhabditida）（小杆亚目）（Rhabditida）；小杆科（Rhabditidae）
粪类圆线虫（*Strongyloides stercoralis*） 傅氏类圆线虫（*S. fuelleborni*） 食道口线虫属（*Oesophagostomum* spp.）	小杆目（Rhabditida）（圆线亚目）（Strongylida）；圆线科（Strongylidae）
喉兽比翼线虫（*Mammomonogamus laryngeus*）	小杆目（Rhabditida）（圆线亚目）（Strongylida）；比翼科（Syngamidae）
十二指肠钩口线虫（*Ancylostoma duodenale*） **锡兰钩口线虫（*A. ceylanicum*）** 巴西钩口线虫（*A. braziliense*） 犬钩口线虫（*A. caninum*） **美洲板口线虫（*Necator americanus*）**	小杆目（Rhabditida）（圆线亚目）（Strongylida）；钩口线虫科（Ancylostomatidae）
广州管圆线虫（*Angiostrongylus cantonensis*） 哥斯达黎加管圆线虫（*A. costaricensis*）	小杆目（Rhabditida）（圆线亚目）（Strongylida）；后圆线虫科（Metastrongylidae）
毛圆线虫属（*Trichostrongylus* spp.）	小杆目（Rhabditida）（圆线亚目）（Strongylida）；毛圆线虫科（Trichostrongylidae）

[a] 黑体为更重要的虫种，细体为不常见虫种。[b] 小杆目下给出了亚目，这些组传统上是被置于不同的目

（五）节肢动物

节肢动物也属于蜕皮动物，它们分为三叶亚门（三叶虫，已绝种）、螯肢亚门（蝎子、蜘蛛、螨、蜱和相关物种）、甲壳亚门（螃蟹、虾、蝲蛄和蟑象）、多足亚门（蜈蚣和马陆）和六足亚门（包括昆虫），以及少数已灭绝的亲缘关系不确定的种类[20]。医学上重要的分类群存在于所有 4 个现存的亚门中，甲壳亚门、螯肢亚门和六足亚门为专性寄生虫。

多足亚门包含 4 个现存的纲，并且已经提出了这些纲的几个分组[21]。只有 2 个纲有医学上重要的种类：唇足纲（蜈蚣）和倍足亚纲（马陆）。一些蜈蚣（特别是蜈蚣目的成员）会导致毒性咬伤。马陆产生有毒的防御性分泌物，或作为寄生虫的中间宿主，如大巨吻棘头虫（棘头纲）。

在医学上有重要意义的甲壳类动物出现在颚足纲和软甲纲。包括桡足动物（颚足纲：桡足纲），它们是麦地那龙线虫（几内亚龙线虫）和裂头绦虫（绦虫）的中间宿主，以及各种蟹类和蝲蛄（软甲纲：真软甲亚纲：十足目）作为并殖吸虫（吸虫）的中间宿主。通常称为舌形虫的五口虫（颚足纲：五口虫纲：舌形虫目）是内脏舌形虫病的病原体（表 135-6）。

螯肢动物亚门分成 2 个纲，肢口纲包括鲎（剑尾目）和已绝种的海蝎（板足鲎亚纲），蛛形纲包括蜘蛛、蝎子、螨和蜱。只有蛛形纲包含医学上重要的虫种。蛛形纲，特别是蜱螨亚纲的系统发生仍在不断更新中，需要进一步的研究[22]。蛛形纲在医学上的重要性表现为多种方式。一些蜘蛛（蜘蛛目）和许多蝎子（蝎目）的咬伤和刺伤均会造成潜在的危及生命的危害。一些蜘蛛（如捕鸟蛛科的狼蛛）具有螯毛。尘螨（蜱螨亚纲：尘螨科）及其粪便会引起严重的过敏反应。医学上最重要的蛛形纲动物是专性体外寄生的虱和蜱螨亚纲的螨（表 135-6），包括疥螨（疥疮的病原体）、硬蜱（硬蜱科）和软蜱（软蜱科）。蜱是许多导致严重疾病病原体的载体，其中包括伯氏疏螺旋体（莱姆病）、巴

表 135-6 节肢动物门（动物界：蜕皮动物超门）

代表性属和种	目和科	医学意义
甲壳纲(Crustacea)：颚足纲(Maxillopoda) 舌形虫亚纲(Pentastomida)		
腕带蛇舌状虫(*Armillifer armillatus*) 大蛇舌状虫(*A. grandis*) 响尾蛇孔头舌虫(*Porocephalus crotali*)	孔头舌虫目(Porocephalida)：孔头虫科(Porocephalidae)	舌形虫病病原体
锯齿舌形虫(*Linguatula serrata*)	孔头虫目(Porocephalida)：舌形虫科(Linguatulidae)	舌形虫病病原体
蛛形纲(Arachnida)，蜱螨亚纲(Acari)(螨和蜱)		
人疥螨(*Sarcoptes scabiei*)	疥螨目(Sarcoptiformes：疥螨科(Sarcoptidae)(痒螨)(itch mites)	疥疮病原体
柏氏禽刺螨(*Ornithonyssus bacoti*) 囊禽刺螨(*O. bursa*) 林禽刺螨(*O. sylviarum*) 鸡皮刺螨(*Dermanyssus gallinae*) 类脂恙虫(*Liponyssoides sanguineus*) 毒厉螨(*Laelaps echidnina*)	中气门亚目(Mesostigmata)：巨刺螨科(Macronyssidae) 皮刺螨科(Dermanyssidae)，厉螨科(Laelapidae)(鸟类，啮齿类螨虫)	人畜共患叮咬螨
虱状蒲螨(*Pyemotes tritici*)	恙螨目(Trombidiformes)：蒲螨科(Pyemotidae)(痒螨)	人畜共患叮咬螨
毛囊蠕形螨(*Demodex folliculorum*) 皮脂蠕形螨(*Demodex brevis*)	恙螨目(Trombidiformes)：蠕形螨科(Demodicidae)(毛囊螨)(follicle mites)	蠕形螨病病原体
纤恙螨属(*Leptotrombidium* spp.)	恙螨目(Trombidiformes)：恙螨科(Trombiculidae)(恙螨)(chiggers)	恙虫病病原体的传播媒介
姬螯螨属(*Cheyletiella* spp.)	恙螨目(Trombidiformes)：肉食螨科(Cheyletidae)(姬螯螨)(cheyletiellid mites)	人畜共患叮咬螨
黑脚硬蜱(*Ixodes scapularis*) 太平洋硬蜱(*I. pacificus*) 篦子硬蜱(*I. ricinus*) 全环硬蜱(*I. holocyclus*) 变异革蜱(*Dermacentor variabilis*) 安氏革蜱(*D. andersoni*) 扇头蜱(*Rhipicephalus sanguineus*) 美洲花蜱(*Amblyomma americanum*) 海湾花蜱(*A. maculatum*) 边缘璃眼蜱(*Hyalomma marginatum*) 杆足璃蜱(*H. truncatum*) 棘肢血蜱(*Haemaphysalis spinigera*) 豪猪血蜱(*H. hystricis*) 二棘血蜱(*H. bispinosa*)	蜱亚目(Ixodida)：蜱总科(Ixodidae)(硬蜱)	巴贝虫病，莱姆疏螺旋体病，埃里克体病，无形体病，南欧斑疹热，潮水斑热，兔热病，科罗拉多蜱热，克里米亚-刚果出血热，蜱传脑炎，科萨努尔森林病，波瓦萨病毒热及很多其他疾病病原体的传播媒介，蜱瘫痪病原体
图卡钝蜱(*Ornithodoros turicata*) 赫姆钝缘蜱(*O. hermsi*) 非洲钝缘蜱(*O. moubata*) 塞氏钝蜱(*O. savignyi*) 耳蜱(*Otobius megnini*)	蜱亚目(Ixodida)：软蜱科(Argasidae)(软蜱)	蜱媒回归热螺旋体的传播媒介
六足纲(Class Hexapoda)，昆虫亚纲(subclass Insecta)		
温带臭虫(*Cimex lectularius*) 热带臭虫(*C. hemipterus*) *C. pilosellus*，*C. adjunctus*	半翅目(Hemiptera)：臭虫科(Cimicidae)(臭虫和蝙蝠)(bed and bat bugs)	害虫

（续　表）

代表性属和种	目和科	医学意义
骚扰锥蝽（*Triatoma infestans*） 长红锥蝽（*Rhodnius prolixus*） 大全圆蝽（*Panstrongylus megistus*）	半翅目（Hemiptera）：猎蝽科（Reduviidae）（猎蝽）（assassin bugs）	恰加斯病病原体的传播媒介
人体虱（*Pediculus humanus humanus*） 人头虱（*P. h. capitis*）	啮虫目（Psocodea）：虱科（Pediculidae）（灵长类动物吸血虱）	流行性斑疹伤寒，战壕热及虱传回归热病原体的传播媒介，害虫
耻阴虱（*Pthirus pubis*）	啮虫目（Psocodea）：阴虱科（Pthiridae）（阴虱）（pubic lice）	害虫
舍蝇（*Musca domestica*） 秋家蝇（*M. autumnalis*） 厕蝇属（*Fannia* spp.）	双翅目（Diptera）：蝇科和厕蝇科（Muscidae and Fanniidae）（家蝇）（house flies）	兼性蝇蛆病，吸吮线虫病原体的传播媒介
伏蝇属（*Phormia* spp.） 嗜人锥蝇（*Cochliomyia hominovorax*） 软解锥蝇（*C. macellaria*） 丽蝇属（*Calliphora* spp.） 蛆症金蝇（*Chrysomya bezziana*） 塞内加尔火蝇（*Auchmeromyia senegalensis*）	双翅目（Diptera）：丽蝇科（Calliphoridae）（丽蝇）（blow flies）	兼性蝇蛆病
麻蝇属（*Sarcophaga* spp.） *Wohlfahrtia vigil* *W. opaca*	双翅目（Diptera）：麻蝇科（Sarcophagidae）（食肉蝇）（flesh flies）	兼性蝇蛆病
黄蝇属（*Cuterebra* spp.） 人肤蝇（*Dermatobia hominis*） 羊狂蝇（*Oestrus Ovis*） 胃蝇属（*Gasterophilus* spp.） 皮蝇属（*Hypoderma* spp.）	双翅目（Diptera）：狂蝇科（Oestridae）（肤蝇）（bot flies）	专性蝇蛆病
印鼠客蚤（*Xenopsylla cheopis*） 人致痒蚤（*Pulex irritans*） 猫蚤（*Ctenocephalides felis*） 犬蚤（*C. canis*）	隐翅目（Siphonaptera）：蚤科（Pulicidae）（人、猫、狗和啮齿动物跳蚤）	鼠疫，猫立克次体和鼠型斑疹伤寒病原体的传播媒介，复孔绦虫和膜壳绦虫的中间宿主
穿皮潜蚤（*Tunga penetrans*） *T. trimamillata*	隐翅目（Siphonaptera）：潜蚤科（Tungidae）（沙蚤）（chigoe fleas）	潜蚤病病原体

贝虫（巴贝虫病），立克次体（落基山斑疹热），回归热的螺旋体，克里米亚-刚果出血热病毒等，还有很多其他的[23]。

六足亚门包含 2 个纲：内口纲（包括无医学价值的微观土居动物）和昆虫纲（昆虫），昆虫是最多样化的现存动物。根据使用的分类方案[24]，昆虫大约有 28 个现存目，其中大约有 8 个目含有医学上有价值的虫种。昆虫在医学上的重要性有非常多的表现方式，最显著的是作为许多病原体的媒介，包括导致疟疾和鼠疫的病原体，以及作为许多虫媒病毒的媒介，或作为蠕虫感染的中间宿主（对具有医学重要性的昆虫和其他节肢动物的全面综述，第 151 章）。表 135-6 的关注点是临床、诊断和参考实验室最常见的体外寄生虫。人体体外寄生昆虫见于半翅目（蝽）、啮虫目[啮虫目＋虱目（虱目＋食毛目），虱]，双翅目（蝇）和蚤目（蚤，所有成虫都是哺乳动物或鸟类的专性寄生虫）（表 135-6）[23]。

值得注意的是，尽管估计有数百万的真核生物种类，但很少的属含有感染人体致病的虫种。现代标本分析发现了与已知致病群相关的新的机会病原体，但以后还将继续发现与已知致病属无关的其他病原体。现在人们能够将环境中的重要株鉴定至种，从而可以开发出标志物。

参考文献请扫二维码查阅

第136章 寄生虫样本的采集、运输和处理

ROBYN Y. SHIMIZU，LYNNE S. GARCIA

（胡媛 译；马莹、曹建平 审校）

常规寄生虫诊断通常依据形态学标准，而不是通过培养特征、生化反应和（或）生长发育特性来检测临床标本中的病原生物（表136-1）。寄生虫鉴定通常基于光镜下对浓集和（或）染色样本的分析。微小生物通常需要在高倍镜，如油镜（×1000）下观察。此外，专为检测粪便中DNA或抗原[例如，肠贾第鞭毛虫、蓝氏贾第鞭毛虫、十二指肠贾第鞭毛虫、隐孢子虫和溶组织内阿米巴（表136-2）]，或者是血液中的疟原虫循环抗原而设计的新型商业检测试剂盒，拓展了方法学范围。除了直接检测寄生虫的方法（形态、抗原和核酸扩增试验）之外，还发展了许多间接检测寄生虫感染的方法，如针对天然的或是重组寄生虫抗原的特异性抗体的检测，已有商业化检测试剂盒（表136-3）。诊断技术已能够对临床样本中不同种类的原虫和蠕虫进行检测。检测结果的可信度首先依赖于临床样本的正确采集、处理和检测。基于寄生虫的生物学和检测方法的特征，对于疑似样本必须多次送检，以便进一步确诊或排除感染。

表136-1 身体的部位和可能存在的寄生虫[a]

部位	寄生虫
血液	
红细胞	疟原虫、巴贝虫
白细胞	利什曼原虫、刚地弓形虫
全血/血浆	锥虫、微丝蚴
骨髓	利什曼原虫、克氏锥虫、疟原虫、刚地弓形虫
中枢神经系统	猪带绦虫、细粒棘球绦虫、福氏耐格里阿米巴、棘阿米巴、狒狒巴拉姆希阿米巴、刚地弓形虫、微孢子虫[b]、锥虫
肠道	溶组织内阿米巴、迪斯帕内阿米巴、结肠内阿米巴、哈氏内阿米巴、微小内蜒阿米巴、布氏嗜碘阿米巴、人囊芽原虫、十二指肠贾第鞭毛虫（蓝氏贾第鞭毛虫、肠贾第鞭毛虫）、迈氏唇鞭毛虫、脆弱双核阿米巴、人毛滴虫、结肠小袋纤毛虫、隐孢子虫、卡耶塔环孢子虫、贝氏囊等孢子虫、毕氏肠上皮细胞微孢子虫[b]、脑炎微孢子虫[b,c]、肉孢子虫、似蚓蛔线虫、蠕形住肠线虫、钩虫、粪类圆线虫、人鞭虫、微小膜壳绦虫、缩小膜壳绦虫、牛带绦虫、猪带绦虫、阔节裂头绦虫、华支睾吸虫、后睾吸虫、并殖吸虫、血吸虫、布氏姜片吸虫、肝片吸虫、横川（氏）后殖吸虫、异形吸虫
肝、脾	棘球绦虫、溶组织内阿米巴、利什曼原虫、微孢子虫[b]、肝毛细线虫、华支睾吸虫/后睾吸虫、肝片形吸虫
肺	隐孢子虫[c]，棘球绦虫、并殖吸虫、刚地弓形虫、蛔虫的幼虫、粪类圆线虫、钩虫、刚地弓形虫
肌肉	旋毛虫、猪带绦虫（囊尾蚴）、克氏锥虫、微孢子虫[b]、肉孢子虫
皮肤和皮肤溃疡	利什曼原虫、棘阿米巴、狒狒巴拉姆希阿米巴、盘尾丝虫、微丝蚴、人疥螨、人肤蝇、穿皮潜蚤
泌尿生殖系统	阴道毛滴虫、血吸虫、微孢子虫[b]、微丝蚴
眼	棘阿米巴、刚地弓形虫、罗阿罗阿丝虫、微孢子虫[b]、结膜吸吮线虫、猪带绦虫（猪囊虫病）、丝虫

注：[a] 寄生虫包括滋养体、包囊、卵囊、孢子、成虫、幼虫、虫卵、无鞭毛体、锥鞭毛体阶段。这张表没有囊括特定部位的所有寄生虫，但最有可能的生物病原体已列入表中。[b] 传统分类中归于原虫的微孢子虫现在认为更接近真菌。[c] 在严重的免疫抑制的个体中传播

表 136-2　免疫检测粪便样本中寄生虫或寄生虫抗原的商业试剂盒[a]

病原和试剂的名称	生产商和(或)经销商	检测类型	评价[b]
隐孢子虫			根据不同的感染强度检测人隐孢子虫、微小隐孢子虫的基因型和其他虫种
隐孢子虫的微孔板检测试剂盒	Remel/Thermo Scientific	酶免疫测定	可用于未固定的、冰冻的或福尔马林固定的粪便，保留在卡-巴二氏运送培养基中也是可以接收的。http://www.thermofisher.com
Xpect 隐孢子虫检测试剂盒	Remel/Thermo Scientific	免疫层析试验(快速)	可用于未固定的、冰冻的或保存的粪便
PARA-TECT 隐孢子虫	Medical Chemical Corp.	酶免疫测定	可用于未固定的、冰冻的、乙酸钠醋酸福尔马林固定的、福尔马林或选择单管保存的粪便。http://www.med-chem.com
隐孢子虫 CELISA 检测试剂盒	Cellabs	酶免疫测定	可用于未固定的、冰冻的、乙酸钠醋酸福尔马林固定的、福尔马林固定保存的粪便。http://www.cellabs.com.au
隐孢子虫 Cel	Cellabs	直接免疫荧光试验	可用于未固定的、冰冻的、或福尔马林保存的粪便
隐孢子虫Ⅱ检测	TechLab/Alere	酶免疫测定	可用于未固定的、冰冻的、乙酸钠醋酸福尔马林或福尔马林保存的粪便。Cary-Blair 或 C&S 转运培养基保存的样本也可以接收 https://alere.com/en/home.html
溶组织内阿米巴			鉴别溶组织内阿米巴和迪斯帕内阿米巴
溶组织内阿米巴Ⅱ检测	TechLab/Alere	酶免疫测定	需要用未固定的或冰冻的粪便
溶组织内阿米巴快速检测	TechLab/Alere	免疫层析试验(快速)	需要用未固定的或冰冻的粪便；区分溶组织内阿米巴和迪斯帕内阿米巴
阿米巴 CELISA 路径	Cellabs	酶免疫测定	需要未固定的或冰冻的粪便，Cary-Blair or C&S 转运培养基保存的粪便可以接收
溶组织内阿米巴/迪斯帕内阿米巴组			无法区分溶组织内阿米巴和迪斯帕内阿米巴
ProSpecT 溶组织内阿米巴的检测	Remel/Thermo Scientific	酶免疫测定	需要未固定的或冰冻的粪便，Cary-Blair 转运培养基保存的粪便可以接收
贾第虫			
ProSpecT 贾第虫的检测 ProSpecT 贾第虫 EZ	Remel/Thermo Scientific	酶免疫测定	可用于未固定的、冰冻的、乙酸钠醋酸福尔马林或福尔马林固定的粪便
PARA-TECT 贾第虫检测	Medical Chemical	酶免疫测定	可用于未固定的、冰冻的、乙酸钠醋酸福尔马林或福尔马林或选择性单管固定的粪便
贾第虫-CELISA	Cellabs	酶免疫测定	可用于未固定的、冰冻的、乙酸钠醋酸福尔马林或福尔马林固定的粪便
贾第虫-Cel	Cellabs	直接免疫荧光试验	可用于未固定的、冰冻的、乙酸钠醋酸福尔马林或福尔马林固定的粪便
Xpect 贾第虫	Remel/Thermo Scientific	免疫层析试验检测	可用于未固定的、冰冻的或福尔马林固定的粪便
贾第虫 Ⅱ	TechLab/ Alere	酶免疫测定	可用于未固定的、冰冻的或福尔马林固定的粪便
隐孢子虫和贾第虫联合检测			
ProSpecT 隐孢子虫/贾第虫检测	Remel/Thermo Scientific	酶免疫测定	可用于未固定的、冰冻的或福尔马林固定的粪便
Merifluor 隐孢子虫/贾第虫检测	Meridian Bioscience	直接免疫荧光试验	可用于未固定的、冰冻的、乙酸钠醋酸福尔马林或福尔马林固定的粪便 http://www.meridianbioscience.com

（续　表）

病原和试剂的名称	制造商和(或)经销商	试验类型	评价[b]
PARA-TECT 隐孢子虫/贾第虫直接免疫荧光试验	Medical Chemical	直接免疫荧光试验	可用于未固定的、冰冻的、乙酸钠醋酸福尔马林或福尔马林和选择性单管固定的粪便
隐孢子虫/贾第虫-Cel	Cellabs	直接免疫荧光试验	可用于新鲜的、冰冻的或福尔马林固定的粪便
隐孢子虫/贾第虫免疫快检卡	Meridian Bioscience	免疫层析试验(快速)	可用于新鲜的、冰冻的或福尔马林固定的粪便
Xpect 贾第虫/隐孢子虫	Remel/Thermo Scientific	免疫层析试验(快速)	可用于新鲜的、冰冻的或福尔马林固定的粪便
贾第虫/隐孢子虫检测	TechLab/Alere	酶免疫测定	可用于新鲜的、冰冻的或福尔马林固定的粪便
贾第虫/隐孢子虫快速检测	TechLab/Alere	免疫层析试验(快速)	可用于新鲜的、冰冻的或福尔马林固定的粪便
贾第虫/隐孢子虫/溶组织内阿米巴	TechLab/Alere	酶免疫测定	可用于新鲜的或冰冻的粪便样本。区分溶组织内阿米巴和迪斯帕内阿米巴
Triage 寄生虫检测试剂盒	Biosite Diagnostics, Inc.	免疫层析试验(快速)	可用于未固定的或冰冻的粪便;贾第虫和溶组织内阿米巴/迪斯帕内阿米巴的联合检测;不能区分溶组织阿米巴和迪斯帕内阿米巴

注:[a] 这不是所有试剂的完整清单但反映了已有试剂的信息,查看试剂的包装说明很重要,试剂的包装说明中未提及的其他固定剂使用前必须验证;[b] 当公司的名字第一次在表中出现时列出网址

表 136-3　免疫学检测血清特异性抗体的商业试剂或抗原[a]

疾病(病原)	制造商和(或)经销商[b]	试验类型[c]	评论
原虫			
弓形虫病(刚地弓形虫)			见第 141 章血清学试验
阿米巴病(溶组织内阿米巴)	Biotrin Int.	EIA	对于肠外阿米巴病,血清学试验被认为是最好的诊断工具。早期的肠外感染易漏诊(推荐跟进);感染迪斯帕内阿米巴不能诱导产生可检测的抗体
	Bordier Affinity	EIA	
	Chemicon Int.	EIA	
	NovaTec Scimedx Corp.	EIA	
		EIA	
恰加斯病(克氏锥虫)	Hemagen Diagnostics	EIA	
	InBios	EIA,IC	
	NovaTec	EIA	
	Operon	EIA	
	Oxford Biosystems		
	Scimedx Corp.		
利什曼病	Bordier Affinity Products	EIA	对内脏利什曼病最有用
	NovaTec	EIA	
	Scimedx Corp.	EIA	
蠕虫[d]			
蛔虫病	NovaTec	EIA	在感染其他蠕虫时出现交叉反应
	Oxford Biosystems	EIA	
	Scimedx Corp	EIA	
猪囊虫病(猪带绦虫)	NovaTec	EIA	与其他蠕虫感染可发生交叉反应(特别是包虫病)
	Scimedx Corp.	EIA	
血吸虫病(裂体吸虫)	Bordier Affinity Products	EIA	
	NovaTec	EIA	
	Oxford Biosystems	EIA	
	Scimedx Corp.	EIA	
囊型包虫病(细粒棘球绦虫)	Bordier Affinity Products	EIA	非种特异性;与泡型包虫病有交叉反应;其他蠕虫感染的患者会发生假阳性反应(特别是囊虫病)

（续　表）

疾病(病原)	制造商和(或)经销商[b]	试验类型[c]	评论
	Launch Diagnostics	EIA	
	Oxford Biosystems	EIA	
泡型包虫病(多房棘球绦虫)	Bordier Affinity Products	EIA	泡型包虫病的筛选试验；可能与囊型包虫病出现交叉反应
类圆线虫病(粪类圆线虫)	Bordier Affinity Products	EIA	可能会与其他蠕虫感染的患者发生交叉反应
	InBios	EIA	
	Scimedx Corp.	EIA	
弓蛔虫病(犬蛔虫)	Bordier Affinity Products	EIA	
	NovaTec	EIA	
	Scimedx Corp.	EIA	
旋毛虫病(旋毛虫)	Oxford Biosystems	EIA	与其他蠕虫感染的患者存在大量的交叉反应
	Scimedx Corp.	EIA	
丝虫病	Bordier Affinity Products	EIA	
	NovaTec	EIA	

注：[a] 这不是所有试剂的完整清单但列出已有试剂的信息；[b] Biotrin 公司网址，http://www.biotrin.com；Bordier 公司的产品目录，http://www.bordier.ch；Chemicon 公司网址，http://www.fishersci.com；Hemagen，http://www.hemagen.com；InBios，http://www.inbios.com；Launch Diagnostics Limited，http://launchdiagnostics.com；NovaTec，http://www.novatec-id.com；Operon，http://operon.es；Oxford Biosystems and Cadama，http://oxfordbiosystems.com；Scimedx Corp，http://scimedx.com；[c] 缩写：EIA. 酶免疫测定，IC. 快速免疫层析(一些是试条、检测卡或其他快速检测形式)；[d] 由于存在广泛的交叉反应，特别是线虫感染，不推荐血清学试验

一、样本采集和运输

针对可能含有寄生虫或寄生成分的样本，有各种不同的采集方法(表 136-4 至表 136-7)[1-7]。应基于各种方法的适用性及其局限性来选择采集方法。最终的实验结果依赖于寄生虫的复苏、鉴定及标本的最初处理。除非适合的样本经过恰当的收集和处理，否则，可能检测不到感染。因此，样本拒收的标准要比病原的诊断过程更为重要。实验室诊断结果如果是基于不恰当的样本采集方法，可能需要花费大量的时间和物力，结果还会误导医生。作为持续提升实验室质量的一个部分，检测结果的产生必须开始于严格的样本接收和拒收标准。另外，诊断实验室应该向医生提供分析前需要的明确信息。

每一个样本都是潜在的传染源，因此，所有的新鲜样本必须小心处理。应对实验室人员进行适当培训。安全的预防措施应该包括个人防护装备、试剂正确标识、指定特定的样本处理区域(通风柜用于减少化学暴露，在一定条件下，如寄生虫的培养，需要生物安全柜)、选择适当的容器来离心、可接受的样本丢弃原则，以及工作区域禁止饮食、喝水和抽烟，尽可能使用恰当的病原培养和(或)动物接种技术。适当的时候，尤其是处理血液或其他体液样本时，必须要遵循生物安全预防措施[8-9]。美国疾病预防和控制中心(CDC)为疑似埃博拉等出血热病毒感染的样本处理提供了额外的指南(https://www.cdc.gov/vhf/ebola/laboratory-personnel/safe-specimen-management.html)。

(一)新鲜粪便的采集

粪便收集进行寄生虫检测需要在钡餐造影试验之前进行。含有不透明的硫酸钡悬浮液的粪便样本是不能用于检测的，并且，患者在使用过钡餐的 5～10 天内是检测不到肠道原虫的。特定物质或药物也会影响肠道原虫的检测，包括矿物质油、金属铋、抗菌药物(甲硝唑和四环素)、抗疟药物和不吸收的抗腹泻药物。服用这些成分中的任意一种，一到数周内肠道寄生虫可能不会恢复。因此，样本的收集需要在使用过钡餐或抗生素后分别再推迟 5～10 天或至少 2 周[1-2,10-11]。一些实验室在其阴性报告中加入如下的备注：特定的抗生素比如甲硝唑或四环素可能干扰肠道寄生虫尤其是肠道原虫的检出。

粪便样本需要收集在干净的广口容器中，常

选择带一个紧密盖子的蜡纸或塑料的容器。样品不能被尿或水污染，因为水中包含自由生活的生物，可能会被误认为是人类寄生虫，尿可能会破坏活动的生物。装有粪便样本的容器在转运到实验室进行检测时，应该放在塑料袋中。如果使用邮递业务，所有检测样本必须按照国家或国际上的要求进行包装（如标记上联合国的代码3373，一份样本分装于3个容器）。样本应该明确标上患者的名字和身份证号、医生姓名，以及样本收集的时间和日期。样本也要附上申请单，说明要进行哪些实验室检测。除了假定的诊断和旅行史之外，美国的居住状态可能是有用的信息（如在鉴别诊断中考虑了巴贝虫），应该和检测要求放在一起。在某些情况中，联系医生获取患者的其他病史也十分必要。

过去，推荐治疗前粪便查寄生虫需要3份样本。3份样本需要如上的收集步骤，治疗后的检查也是如此。然而，原虫感染的患者需要在治疗后的3～4周检查，绦虫感染的患者需要在治疗后5～6周检查。在很多情况下，为了控制成本，治疗后的样本没有收集，如果患者再次出现症状，可以再次提交样本[3-4]。

至于方法有不同说法，有的建议收集1份或2份样本，也有建议将3个样本合在一起作为一个单独的样本检测，这又出现一些争议。但是，医生需要意识到一个样本检测相关的寄生虫的检出率只有50%～60%，而3份样本检出率大于95%[4]。

如果收集1例患者的3份样本，那么它们应该在不同的日期提交。如果有可能，这些样本应该每隔1天提交1份，否则，这3份系列样本应该在10天内提交。如果1例患者需要送检6份样本，这些样本也应在不同天收集，或者在14天内收集6份样本[1]。许多病原生物，特别是肠道原虫，不会每天在粪便中出现同样的数量，充分的检测是至少送检3次，而且1例患者的多份样本不要在同一天提交。有一种例外的情况是，当患者有严重的水样腹泻时，由于液体流失引起大量的补液，任何生物体都可能被稀释而检测不出来。这些样本必须在咨询过医生后才能接收。虽然笔者也不推荐连续3天每天提交1份样本，但用这种方式收集的样本也可以用来检测。

为了评价有患贾第虫病风险的患者是否感染贾第虫，单份粪便样本的免疫检测阴性不足以排除贾第虫感染的可能性。临床上中度或高度怀疑贾第虫感染的病例，第一次检测为阴性的，推荐进行第二次样本检测[12]。

表 136-4 样本的制备、相关寄生虫推荐的染色方法和附加信息[a]

身体部位	样本制备	相关寄生虫推荐方法	附加信息
血液	镜检[b]：薄血膜和厚血膜；新鲜血液（推荐）或 EDTA 抗凝血（EDTA 完全覆盖的管子注满血液，然后混合）	吉姆萨染色（所有的血液寄生虫）；苏木素染色（带鞘微丝蚴） 疟原虫：推荐经静脉穿刺后采集的血液样本在30～60 min内制备厚薄血膜（其他检测可作为补充）	大部分绘画或描述的血液寄生虫是以吉姆萨染色的血片为基础的，尽管可用瑞氏染色（或瑞氏-吉姆萨联合染色），疟原虫胞浆中看不到沉积物，病原的颜色与描述的不相匹配。然而用其他的染色方法（列于前面，加上一些快速的血液染色），应该可以在血片上检测到病原
	浓集法：EDTA-血 抗原检测：疟疾用 EDTA 抗凝血，血清或血浆用于检测循环抗原（溶血样本可用于其他检测）	血白细胞层、膜过滤、新鲜的血膜可用于检测运动的微丝蚴或锥虫 用于检测疟原虫和一些微丝蚴的商业化的免疫检测试剂盒，敏感性不会高于疟原虫的厚血膜，但比利什曼原虫血片检测更敏感（所用的外周血只用于免疫缺陷的患者）	用抗凝剂收集的血液（相比于新鲜血液）与外周血膜上观察到的疟原虫形态直接相关。如果血膜是在采样后1 h或更久制备的，即使用了正确的pH缓冲液，疟原虫中也看不到胞浆内的沉积物。而且，如果血液保存在室温（移除瓶塞），雄配子体可摆动，使雌配子受孕，并在试管血液中继续发育（如同在宿主蚊体内），动合子可以和恶性疟原虫配子体相似，而小配子体片段与螺旋体相似

（续　表）

身体部位	样本制备	相关寄生虫推荐方法	附加信息
	核酸扩增[c]：EDTA-抗凝血，乙醇固定或未固定的薄、厚血膜、抗凝血、可能溶血或冰冻的血液样本	产物测序常用于进行种或基因型的鉴定	到目前为止，没有经FDA确认过的商业检测试剂，需要在高水平的实验室进行检测（可用冰冻的、抗凝的或溶血的样本进行操作）
	特异性抗体检测：血清或血浆、抗凝血、凝血（溶血样本会在一些实验中出现问题）	常用的是用酶免疫测定的方法（可以买到商业检测试剂）、酶免疫转移印迹试验（有些商业检测试剂可用于寄生虫的检测）和间接免疫荧光试验	许多实验室用的是自己实验室的检测方法，只有很少一部分明确定义的抗原有商业检测试剂；实验室应该明确规定检测的敏感性和特异性
骨髓	活组织检查或穿刺 镜检：穿刺的样本加EDTA抗凝后制备成薄或厚血膜 培养：无菌培养物加EDTA或培养基 核酸扩增：穿刺物加EDTA	吉姆萨染色（所有血液中的寄生虫） 特异性微生物应该用特殊的培养基或细胞系进行培养	网状内皮系统来源的细胞中可收集利什曼原虫无鞭毛体。如果样本收集后没有直接制备血膜，感染的细胞会破裂。镜检敏感性比较低，需要与其他方法联合 利什曼原虫、克氏锥虫和刚地弓形虫可进行体外培养 血液寄生虫如：利什曼、弓形虫和其他寄生虫可进行分子扩增试验
中枢神经系统	镜检：脊髓液和脑脊液（湿片检查、染色涂片）、脑活组织检查（印片或压片制备、染色） 培养：无菌穿刺或组织活检的材料（放在生理盐水中） 核酸扩增：穿刺或组织活检的材料、天然的、冻存的或乙醇固定的材料	染色：吉姆萨染色（锥虫、弓形虫）；吉姆萨染色、三色染色或荧光增白剂染色（耐格里属-PAM、棘阿米巴属、巴拉姆希-GAE阿米巴）；吉姆萨染色、抗酸染色、糖原染色、改良三色染色、六亚甲四胺银染色（染微孢子）（常规组织学染色还可推荐革兰染色（染微孢子）；HE染色（绦期幼虫，猪肉绦虫囊尾蚴、棘球绦虫） 营自由生活的阿米巴（例外：巴拉姆希阿米巴在常规细菌覆盖的琼脂中不生长）弓形虫可以在组织培养基中培养 原虫和蠕虫：种和基因型的特征	如果可以采集到脑脊液（无可疑的病原），吉姆萨染色是最好的选择；然而，三色染色、改良三色染色或荧光增白剂染色也推荐作为第二种选择（对于阿米巴包囊或微孢子虫）。如果采集到脑组织活检的样本（特别是免疫缺陷的患者），推荐进行核酸扩增试验（NAAT），从种和基因型的水平进行诊断和鉴定 应该冻存少量的样本进行分子生物学分析，防止其他方法没有检测出来时，留样再测
皮肤溃疡	镜检：穿刺或组织活检的材料（涂片、印片或压片制备、组织切片） 培养（少见） 核酸扩增：穿刺、组织活检材料、天然、冻存或乙醇固定的材料	吉姆萨染色（利什曼原虫）；HE常规组织染色（棘阿米巴、狒狒巴拉姆希阿米巴、和溶组织内阿米巴） 利什曼原虫、营自由生活的阿米巴（经常被细菌污染） 利什曼原虫（种鉴定），营自由生活的阿米巴	大部分病原是利什曼原虫，可用吉姆萨染色。糖原染色（PAS）或甲胺银染剂（GMS）可用于区别组织中的荚膜组织胞浆菌（PAS+GMS+）和利什曼原虫（PAS−GMS−）。镜检的敏感性低 对于免疫缺陷的患者，文献报道皮肤溃疡常见于阿米巴感染引起 皮肤溃疡的材料进行组织培养，常被细菌污染；核酸扩增应该是较好的选择
眼	镜检：组织穿刺的材料（涂片、印片或压片制备），刮屑、隐形眼镜、隐形眼镜溶液沉积物 培养：天然材料（如上）放于PBS中，添加抗生素，防止细菌增殖 核酸扩增：天然材料放于生理盐水或PBS、乙醇中或冻存	荧光增白剂染色（仅用于染棘阿米巴包囊，微孢子目）；吉姆萨染色（染阿米巴滋养体、包囊）；改良三色染色（优先）或甲胺银染色、糖原染色、改良抗酸染色（微孢子虫孢子）；组织常规的HE（囊尾蚴、罗阿罗阿丝虫、弓形虫、恶丝虫属） 培养：营自生生活的阿米巴（除了狒狒巴拉母希阿米巴）和弓形虫 自生生活的阿米巴、弓形虫、微孢子虫种和基因型的鉴定	镜检鉴定蠕虫的成虫比常规的组织学检查有用 棘阿米巴是引起角膜炎的重要病原。尽管荧光增白剂可以染包囊，但它不能染滋养体。因此，角膜炎病原疑为阿米巴时，这几种染色方法都要用上。常规HE染色可用于检测和鉴定猪囊虫病。当从眼中检出罗阿罗阿丝虫的成虫时可用镜检或常规的组织学方法进行染色和检查 微孢子虫种和基因型水平的鉴定需要进行核酸扩增和测序分析。孢子经荧光增白剂染色或改良三色染色后可以在常规的光镜下检测到，镜检的敏感性较低

（续 表）

身体部位	样本制备	相关寄生虫推荐方法	附加信息
肠道	粪便和肠道其他内容物 镜检：粪便、乙状结肠镜检查的取材、十二指肠内容物[所有新鲜的或固定的(表136-4)]，直接的湿片检查，浓集法 成虫或绦虫节片检测	浓集法：对于福尔马林、SAF或单瓶固定保存的粪便样本进行福尔马林-乙酸乙酯沉淀检测（大部分是原虫）；漂浮或联合沉淀漂浮法（检测蠕虫的卵）；琼脂平板或贝尔曼浓集法（检测粪类圆线虫的幼虫，需要未固定的粪便） 直接的湿片检查（用于直接检查没有固定的新鲜的材料）；（也用于检测活动的原虫滋养体、蠕虫卵和原虫的包囊） 染色：三色或铁苏木素染色（检测肠道原虫）；改良三色染色（检测微孢子）；改良抗酸染色（检测隐孢子虫、环孢子虫和囊等球虫） 胶带黏附蛲虫，不需要染色	用福尔马林或单瓶固定液固定粪便，保存滋养体的形态，便于延长保存时间（室温）和长时间的转运，阻止血吸虫虫卵的孵化，但不能使粪类圆线虫幼虫的浓集，妨碍进一步核酸扩增分析 绦虫卵不能进行种的鉴定 如果粪便检查需要延迟，那么粪便样本的固定是非常必要的。微孢子虫：种或基因型水平的鉴定需要分子水平的检测；而改良三色染色和（或）荧光增白剂染色可用于鉴定孢子的存在 胶带检查4～6次连续阴性可以排除蛲虫感染，儿科医生经常仅凭症状治疗
		卡红染色（很少用于成虫或绦虫节片） 不用组织染色，节肢动物通常在属的水平被鉴定（带绦虫属、裂头绦虫属、膜壳绦虫属）	成虫节片可用特殊方法进行染色。绦虫节片注射印度墨水对于观察子宫分枝非常有效。然而，经乙醇和二甲苯（或二甲苯替代品）脱水后，可看见性器官和子宫的分支结构，可对节片进行种的鉴定。乳酸酚透明可能有效
	抗原检测：新鲜天然的或冰冻的材料；恰当的固定也是试验所需要的 核酸检测：天然的材料，新鲜的，冰冻的或乙醇固定的组织活检 镜检：固定组织切片或印片或压片制备并染色 核酸扩增：见上述	免疫检测商业试剂（表136-2），如免疫酶测定、免疫荧光、检测卡等形式（溶组织内阿米巴、溶组织内阿米巴/迪斯帕内阿米巴组和贾第虫和隐孢子虫）。实验室内部检测猪链状带绦虫和牛带绦虫 商业试剂的使用将检测变得更加便利。对于大部分蠕虫和原虫属或种的鉴定引物可见于发表的文献 HE、常规的组织染色（见于溶组织内阿米巴、隐孢子虫、环孢子虫、囊等球虫、贾第虫、微孢子虫）；在血吸虫、钩虫或鞭虫不常用	粪抗原在潜伏期和虫卵排泄期可以被检测到 由于从粪便样本里抽提DNA有一些潜在的抑制因素，因此在DNA抽提前，样本需要进行浓缩和分离。一些商业的DNA分离试剂盒可有效的从粪便中分离出高质量的DNA。序列分析可进行种和基因型的鉴定 特殊染色有助于鉴定微孢子（组织的革兰染色、银染、糖原染色和吉姆萨染色）或双孢子球虫（改良的抗酸染色）
肝和脾	样本的组织穿刺或抽吸 镜检：生理盐水中未固定的材料；固定的组织 培养或动物接种：天然样本的无菌制备 核酸检测：天然材料，冰冻的或乙醇固定的材料	湿片检测溶组织内阿米巴（滋养体）、棘球蚴原头节、肝毛细线虫的卵。吉姆萨染色（检测利什曼原虫、其他原虫和微孢子虫）；HE染色（常规组织学检测） 见于利什曼原虫（不常见） 腹腔内接种多房棘球绦虫囊性材料进行长期化疗活力测试 种或基因型的鉴定（如细粒棘球绦虫）	明确脾穿刺[穿刺和（或）活检]或肝损伤（细粒棘球绦虫）相关的风险 保留少量的冻存的材料进行核酸的鉴定 大部分的实验室不能进行培养或动物接种的实验
呼吸道	痰或诱导咳痰，鼻窦分泌物 支气管肺泡灌洗液，经纤维支气管镜吸出物，气管支气管吸出物，刷拭活检样本，肺活检样本 镜检：未固定的材料用于涂片制备 核酸检测：未固定的天然材料，冰冻的或乙醇固定的	在未染色的呼吸道样本中可能收集到蠕虫的幼虫（蛔虫、粪类圆线虫），虫卵（并殖吸虫，毛细线虫）或棘球蚴（细粒棘球绦虫） 染色：许多原虫可用吉姆萨染色，包括弓形虫速殖子，改良抗酸染色（隐孢子虫），改良三色染色（微孢子） 常规组织学检测（HE染色，甲胺银染色剂染色，糖原染色，抗酸染色，蠕虫、原虫和微孢子虫的组织革兰染色）	有诊断肺隐孢子虫病的免疫诊断试剂。常规的组织学方法可以鉴定肺部的蠕虫或蠕虫卵。楫记载播散性的弓形虫病或微孢子虫病可在许多不同的呼吸道样本中检获病原

（续 表）

身体部位	样本制备	相关寄生虫推荐方法	附加信息
肌肉	组织活检的材料 镜检：未固定样本用于触压片制备，固定样本用于电镜组织样本制备 PCR：未固定的或天然的，冰冻的或乙醇固定的样本	可鉴定未染色的旋毛虫幼虫（种的鉴定需要单条幼虫进行分子生物学分析）。常规组织学HE染色可检测旋毛虫、囊虫。糖原染色、抗酸染色、组织革兰染色和电镜检查（用于少量微孢子虫检测） 微孢子虫种的鉴定需要进行测序	如果在染色的肌肉中发现克氏锥虫，可用常规组织切片鉴定。改良三色染色和（或）荧光增白剂染色可用于确定微孢子虫孢子 旋毛虫的幼虫只有在重度感染时可被检测到。组织活检不推荐作为标准检测方法
皮肤	抽吸、皮肤的剪刮，活检标本。 镜检：直接检测、湿片检测，染色涂片（或组织切片的固定或电镜检查） 核酸检测：未固定的天然组织，冰冻的或乙醇固定的组织	见皮肤溃疡（同上） 湿片制备（微丝蚴），涂片的吉姆萨染色、HE染色或常规组织学染色[盘尾丝虫、链尾丝虫、匍行恶丝虫，其他导致的皮肤幼虫移行幼虫（人兽共患的粪类圆线虫、钩虫）、利什曼原虫、棘阿米巴、溶组织内阿米巴、微孢子虫、狒狒巴拉姆希阿米巴和节肢动物（疥螨和其他螨虫）] 大部分寄生虫种特异性引物均可获得	任何一种寄生虫都可用常规的组织学方法来鉴定，但这些方法敏感性低
羊水	镜检：涂片染色 核酸检测：天然材料培养	吉姆萨涂片染色 可以使用各种组织培养基	只适用于怀疑产前弓形虫感染的验证 核酸扩增是选择的方法
泌尿生殖系统	阴道分泌物，生理盐水拭子，拭子转运（不加活性炭），涂片空气干燥，进行荧光抗体检测。尿道排出物、前列腺分泌物、尿（单次未固定的，24 h未固定的或早晨的样本）进行检测 镜检：湿片，尿沉渣涂片，涂片染色 培养：阴道或尿道分泌物或拭子培养 分子检测：天然材料、冻存的或乙醇固定的材料	吉姆萨染色、侧流免疫层析法、核酸扩增（阴道毛滴虫）、Delafield苏木素染色（微丝蚴）、改良三色染色法（微孢子）、HE染色常规组织学染色、糖原染色、抗酸染色、组织革兰染色（微孢子）。尿沉淀直接涂片检测埃及血吸虫卵或微丝蚴 阴道毛滴虫的增殖和鉴定（商业化的塑料培养平板）；活动的滋养体可在显微镜下进行检测（或吉姆萨涂片染色）	尽管阴道毛滴虫是最常见的鉴定出的寄生虫，也需要考虑其他病原，常见的病原是微孢子虫。也可收集到被染色的微丝蚴 尿经福尔马林固定后可以阻止血吸虫虫卵的孵出 材料收集后必须立即放到培养基中，不要冷藏或冻存

注：[a] GAE. 肉芽肿阿米巴脑炎；HE. 苏木素和伊红染色；PAM. 原发性阿米巴脑炎；PAS. 糖原染色；PBS. 磷酸盐缓冲液。[b] 在组织材料的切片中，可以检测到许多寄生虫或寄生虫阶段性幼虫。然而，种的鉴定是比较困难的，需要进行进一步的检测。通常，这些技术没有考虑到一线的检测方法。进一步的检测方法如电镜只有在专业的实验室才能开展，不能作为标准的诊断方法。可以进行虫种鉴定的电镜检测很大程度上被核酸扩增取代。[c] 适合于核酸检测的材料/样本：天然（未固定的），放置于生理盐水、PBS或乙醇中的，或冰冻样本、避免加福尔马林。如有可能，应保留一部分样本以备必要的核查

必须收集新鲜样本才能检测到活动的阿米巴、鞭毛虫或纤毛虫的滋养体。通常在腹泻病例样本中发现原虫的滋养体，肠内容物快速通过肠腔，以至于来不及形成包囊。一旦粪便样本排出体外，滋养体不再成囊，如果在粪便排出后短时间内没有进行检测或保存，滋养体可能分解。然而，大部分的蠕虫卵、幼虫、球虫的卵囊和微孢子虫的孢子可生存较长的时间。液体样本应该在排出后30 min内进行检测，而不是到达实验室的30 min内检测。如果推荐的30 min内不能进行检测，样本应该存放到合适的固定液中[2]。软的（半成形的）样本可能含有原虫滋养体和包囊的混合物，应该在排出后1 h内进行检测。同样，如果这个时间内不能进行检测，则样本内需要加入固定液。成形样本立即检查的时间没有严格的规定，实际上，如果样本在排出后24 h内进行检测，原虫的包囊应该仍保持完整。

（二）粪便样本的保存

如果样本从运输到实验室检测有延迟，则需

要考虑使用粪便固定剂。为了保持原虫形态、阻止蠕虫卵和幼虫继续发育,粪便样本在排出后可由患者或医院的工作人员立即使用收集器放到固定剂中。有许多固定剂可供选择,但无论选择哪种固定剂,样本和固定剂的充分混合都非常重要。保存在粪便固定剂中的样本应该存放于室温,样本与固定剂的比例也非常重要,以确保样本正确保存。如果用商业的小瓶作为粪便的储存容器需要标记"刻度"线。

在过去,用盛有福尔马林和聚乙烯醇(PVA)的小瓶来收集样本,而现在有很多固定剂选择,包括单瓶和双瓶的联用。当选择了合适的固定剂,永久的涂片染色对于完成寄生虫检测是必须的[1,2,9-10,13](第137章)。固定剂与所选择的试剂或方法应该是兼容的。另外要注意,包含汞的化合物的处置规定变得更加严格。每个实验室必须检查相关规定以帮助选择合适的固定剂。

1. 福尔马林 福尔马林是一种通用的固定剂,适合于蠕虫卵、幼虫和原虫的包囊。通常使用2种浓度:5%为推荐用于原虫包囊的保存浓度,10%为推荐用于蠕虫虫卵和幼虫的保存浓度。尽管5%的浓度推荐于所有的用途,大部分商业试剂提供的是10%的福尔马林,这个浓度更可能杀死所有的蠕虫卵。为了维持病原的形态,福尔马林中可加入磷酸盐缓冲液(如中性的福尔马林)。特定福尔马林配方的选择由使用者自行决定。福尔马林水溶液可以使样本作为湿片来检测,作为肠道原虫的鉴定,这项技术的准确性低于染色涂片。

原虫的包囊(而非滋养体)、卵囊、蠕虫卵和幼虫可在10%的福尔马林溶液中长期保存。福尔马林加热至60℃用于保存样本中的蠕虫卵,因为在未加热过的福尔马林溶液中,一些厚壳虫卵可继续发育成为感染性虫卵,并可在较长的时间里保持活力。几克粪便应该与5%或10%的福尔马林充分混合(比例为1:10)。

表 136-5 寄生虫的粪便样本:收集和处理的选择

选项	问题	结论
尽管医生可以在认为合适的时候开寄生虫的粪便检查单,许多实验室拒绝对住院超过3天的患者进行粪便检查	患者在住院后数天内出现腹泻的症状,症状通常不是由于寄生虫感染引起的,而是归因于其他原因	这种情况可能与院内感染相关(少见),但隐孢子虫、贾第虫和微孢子虫感染也需要考虑到
单次粪便的寄生虫检查	如果在第一份样本检获寄生虫或者收集第一次粪便样本后患者就无症状,后续的样本就不需要进一步检查。然而对于肠道寄生虫感染,患者会出现便秘和腹泻交替的症状	对单次粪便样本的检查诊断依赖于样本中的虫荷数。如果粪便中有病原存在,单次粪便检查的阳性率为40%~60%,可进行2次寄生虫检查,3次样本会更加敏感。任何有症状的患者需要进一步的检查。1例患者的3次粪便样本,通常不是3次样本都是阳性和(或)不同的病原阳性(是个经济有效的方法)
第一次粪便样本检查为阴性且患者仍有症状的需要进行第二次粪便检查	进一步检查,原虫的检出率会增加(溶组织内阿米巴增加22.7%、贾第虫增加11.3%、脆弱双核阿米巴增加31.1%)	如果要采集第二次(或第三次)粪便样本,需要在收集系列样本推荐的10天内采集,因为原虫是周期性排出。对患者来说可能不太方便,正确的诊断也可能被延迟
单次粪便检测和贾第虫的免疫学检测	如果检测为阴性,患者的症状也消退了,就不需要进一步的检查	患者可能偶尔会出现症状,因此,单次的粪便检查或免疫学检测可能难以排除寄生虫感染。如果患者持续有症状,即使贾第虫免疫学检测为阴性,其他原虫可能会被漏检(隐孢子虫、溶组织阿米巴/迪斯帕内阿米巴和脆弱双核阿米巴)
实验室收集3份样本进行检测,一个进行浓缩涂片,一个进行长久染色	在7~10天内收集3次样本,可以节约时间和费用	过程不推荐。检测的敏感性大大下降,由于稀释的原因,虫荷数下降导致漏检
3份样本中一份制备长久染色的涂片,接着对3份收集的样本进行一次浓缩	在7~10天内收集3次样本,可以在美国原虫常见的地区最大限度地收集到原虫	对于轻度的蠕虫感染可能会漏检(虫卵和幼虫),归因于收集的过程

（续 表）

选项	问题	结论
收集了 3 次样本，但 3 次的粪便样本放在一个瓶中（只给患者一个瓶）	收集这些样本只需要一个瓶	这种方法绝对不推荐，缺乏敏感性，将固定剂和样本正确的混合使患者样本收集复杂化，并依赖于患者的依从性
选择患者进行肠道原虫的免疫学检测[a]（儿童小于 5 岁，来自幼儿园，患者免疫缺陷的患者，并有腹泻暴发）	相对于所有样本进行免疫检测，经这样选择的样本进行检测更有性价比	在实验室，患者的相关信息不易获得。对临床医生制定指征是高度推荐的方法（表 133-7）
推荐对主要的患者而非所有进行单次粪便检测的患者进行分子生物学检测（住在病原流行区的旅行者及住在美国大城市的旅行者）	由于寄生虫病谱的扩展，这个选择将变得更加常见。对于检查为阴性但仍有症状的患者需要进一步进行检查	特异性自动化的检测见表 138-7。检测的病原包括：贾第虫、隐孢子虫、环孢子虫、溶组织内阿米巴复合体、溶组织内阿米巴。正在开发的检测病原包括人囊芽原虫、脆弱双核阿米巴、微孢子虫和圆线虫

注：[a] 对所有的样本进行检测，筛选贾第虫、隐孢子虫或与之相关的原虫，识别早期的腹泻暴发情况比较困难。如果有迹象显示正处于暴发的早期阶段，可将按需求进行免疫学检测或核酸扩增改成对所有样本进行检测

甲醛蒸汽的浓度必须被监测和维持在一定的浓度，极限负荷时间为 8 h。在美国，这些限制是 0.75×10^{-6} 和 15 min 的短期暴露极限（即 2.0×10^{-6}）[1]。然而，这些极限在不同国家是不同的。一般来说，微生物中甲醛的用量非常小，实验室监测值通常远低于极限浓度。在生产、设备、整个过程及人员或控制措施任一环节出现变化均会导致新的或额外的甲醛暴露，应该重复监测。粪便固定剂中包含的福尔马林应该在标签上标明。有许多单瓶采集系统，尽管它们可能不含福尔马林，实际的配方是厂家专有的。

2. 乙酸钠醋酸福尔马林(SAF) SAF 保存的样本用于浓集和永久染色涂片，它是一种液体固定剂，与前面描述的 10% 的福尔马林很相似。沉淀物用来制备永久涂片，常推荐使用涂有白蛋白的玻片，以提高粪便材料与玻璃的黏附[14-15]。

相比于氯化汞，SAF 是一个“更柔和”的固定剂。用最初含有氯化汞的固定剂固定的病原，染色后病原的形态不是很清晰。个人观点，SAF 固定搭配铁苏木素染色比 SAF 固定搭配三色染色可以提供更好的病原形态。尽管 SAF 容易制备，保质期很长，但对于不熟悉粪便样本技术的新手，涂片制作技术有一点困难。实验室考虑使用单一的固定剂，蠕虫的卵和幼虫、原虫的滋养体和包囊、球虫的卵囊和微孢子虫孢子可用此法进行回收。

3. 绍丁液(Schaudinn's fluid) 绍丁液含有氯化汞，可用于新鲜的粪便样本或来自于肠道黏膜表面样本的固定。许多实验室收集的来自住院患者样本（没有在样本运输中耽误时间）经常采用这种方法固定。永久性的染色涂片的制作从固定材料开始，使用绍丁液固定的材料进行浓集技术也是可行的，但应用不是非常广泛[1,10-11]。

4. 聚乙烯醇(PVA) PVA 是一种树脂，通常合并入绍丁固定剂。PVA 粉末作为一种粪便材料的黏附剂（例如，当粪便-PVA 混合物涂在玻片上，由于 PVA 成分，样本可黏附在玻片上）。固定剂仍是绍丁液本身。也许用 PVA 最大的优点是可以制备永久的染色涂片。如同 SAF，PVA 固定液推荐作为保存滋养体和包囊的方式以做进一步的检测，并允许样本通过常规的邮寄方式，从世界上的任何地方运输到实验室，进行后续的检测。PVA 对液体样本特别有用，使用时应该是 3 份 PVA∶1份粪便样本[16]。

5. 改良聚乙烯醇 尽管已开发出不含汞化合物的固定液，一些替代化合物相比于固定剂保存永久染色涂片中原虫的形态质量并不理想。硫酸铜也试过，但其效果不如氯化汞[17]。硫酸锌可作为汞的替代品用于三色染色。包含锌的替代品已广泛使用，每个厂家都有自己专有的固定剂配方[18-19]。

6. 单瓶采集系统 许多厂家已有单瓶粪便采集系统，与 SAF 或改良的 PVA 方法相似。从单瓶中获取的样本可以进行浓缩和长久的染色涂片制备。一些单瓶中的样本还可用来进行免疫检测。询问生产商关于所有诊断方法（浓缩、长久的染色涂片、免疫实验过程和分子的分析）和特定的信息，确认固定剂中没有成分会干扰上述任何一种方法。像含锌替代物，这些配方也是专利产品[19]。新的配方持续在开发，其

中有些没有使用白蛋白或 PVA 作为玻片的黏附剂。一些配方可用于样本浓缩涂片、一些免疫检测和制备长久的染色涂片。有几个商业化的单瓶粪便采集系统无汞和福尔马林，可保存形态，减少许多实验室面临的废物处置和监测问题。无汞、福尔马林和 PVA 的单瓶采集系统市面均有售。

(三)血液收集

依据生活史，可以在血液样本中发现许多寄生虫，包括全血、制备的血沉棕黄层或多种类型的浓缩样本[2,10-11]。这些寄生虫包括疟原虫、巴贝虫、锥虫、利什曼原虫、弓形虫和微丝蚴。尽管一些病原在新鲜的全血样本中是可以运动的，种的鉴定通常进行薄血膜或厚血膜的永久染色检查。血膜可由新鲜而不加抗凝剂的全血、加抗凝剂的全血或各种浓缩的沉淀样本来制备。

除非确定已有准备充分的涂片可用，否则要求一管新鲜的血液(加 EDTA 抗凝剂更完美)和制备涂片是有必要的。装有血液的试管需要提供合适的血液/抗凝剂的比例。如果是为了检测胞浆内的颗粒(例如，色素颗粒)，血膜需要在采样后 1 小时内制备。过了这个时间，在染色的血膜片上可能看不到色素颗粒，但整个病原的形态仍是非常清楚的。多数实验室常规使用市售血液采集管，实验室没有必要准备 EDTA 采集管。

样本采集时间应在血液采集管上标明，并在结果报告中明确显示。医生可以将相关结果与发热的模式(最有可能的是具有部分免疫力的患者，过去患过疟疾并产生了抗体)或患者的其他症状相联系。在之前没有接触过疟疾的免疫功能低下的患者或旅行者，发热没有周期性，症状类似于许多其他的感染或疾病。应该将检测结果形成评价报告反馈给医生，并说明一次阴性结果也不能排除寄生虫感染的可能性[1,20]。

(四)从身体其他部位收集样本

尽管可从身体其他部位采集临床样本，但还没有合适的诊断方法来处理这些样本，如同常规处理粪便或血液样本[21-22]。从身体其他部位采集的大部分样本(表 136-1)可作为新鲜样本开展进一步检测。

二、常规直接检测方法

(一)肠道样本

提交给诊断实验室的最常见的样本是粪便，最常见的寄生虫检测是虫卵和寄生虫检查，包括 3 种方法：直接涂片、浓缩法和永久染色片。直接涂片需要新鲜的粪便，常用于检测活动的原虫滋养体，在显微镜低倍或高倍镜下检测[放大 100 倍，22×22mm 盖玻片(观察幼虫、大的蠕虫卵)]；放大 400 倍，22×22mm 盖玻片的 1/3～1/2[观察原虫包囊和(或)滋养体，小的蠕虫卵]。如果实验室收到的样本是经过固定的粪便样本，可能不能做直接涂片进行常规虫卵和寄生虫的观察。

第二种是浓集法检测虫卵和寄生虫。浓集法便于收集原虫的包囊和卵囊、微孢子虫的孢子和蠕虫的虫卵及幼虫。漂浮(硫酸锌、氯化锌和其他)和沉淀法都可以，最常见的是福尔马林乙酸醋酸沉淀法，之前称为甲醛乙醚法。浓缩样本是为了湿涂片检测做准备，加或不加碘(根据个人偏好)，用低或高倍镜(×100 和×400)进行湿涂片检测。重要的是要记住当漂浮的液体密度小于 1.35 时，大的重的蠕虫卵(未受精的蛔虫卵)或有盖的虫卵(吸虫和绦虫卵)不能进行浮聚优化，表膜层和沉淀都必须用此方法检查。同样重要的是应注意，选择高密度的漂浮液体可能会改变一些寄生虫的形态特征。

虫卵和寄生虫的第三种检查方法是永久染色涂片，这种方法便于鉴定肠道原虫。有许多种染色方法，最常见的是惠特利改良的 Gomori 组织三色染色和铁苏木素染色。这部分的检查对于涂片检查疑为阳性的样本和确定湿片中看不到的原虫是至关重要的。永久染色涂片镜检要使用油镜(先用×600 进行筛选，最终用×1000 观察≥300 个油镜视野)。

肠道里的其他样本，如十二指肠抽吸或引流液，肠胶囊技术获取的黏液，乙状结肠镜检查材料可进行湿涂片和永久染色涂片检查，永久染色涂片需三色染色或铁苏木素染色。成人或儿童的肠胶囊测试目前可以从英国 Newton Abbot 的 Nutri-Link 公司购买(www.nutri-linkltd.co.uk)。尽管不是所有的实验室都可以检测这些类型的样本，但他们可以对诊断检测提出可能的需求。

(二)羊水

先天性弓形虫感染的诊断方法在第141章已总结。在无菌的条件下收集羊水既可接种于小鼠或组织培养基，也可进行分子诊断。核酸扩增是检测羊水中弓形虫的推荐方法。

(三)尿道样本

阴道毛滴虫的确诊通常是基于阴道或尿道排泄物的湿涂片和前列腺分泌物或尿沉渣的显微镜检查。在查到病原前需要进行多个样本的检测。用生理盐水对这些样本做系列的稀释，并在低倍镜(×100)下进行观察，减弱光线，便于观察到活动的病原。随着运动消失，特别是在高倍镜(×400)下，可以观察到阴道毛滴虫波动膜活动。可以购买商业化的培养基(InPouchTV；BioMed Diagnostics，White City，OR)，可以在这种培养基中进行病原的接种、转运、培养和镜检[1,23]。还可以购买检测阴道毛滴虫抗原和分子的快速检测试剂盒(例如，DNA探针和核酸的扩增)。

染色涂片如巴氏或吉姆萨染色涂片可以使用，但对病原的鉴定没有必要，并且难以解释。如果实验室收到干涂片，可用无水乙醇固定，用吉姆萨染色，这种方法不是最优的，但涂片可进行检查并可能确定阳性感染。基于染色涂片得到的假阳性或假阴性结果的数量表明，通过在载片、或恰当的培养基观察活动的病原，或进行更加敏感的抗原及分子学检测来进行确诊(表136-3)[5]。

检测尿沉渣可以明确丝虫的感染。有报道提出给予枸橼酸乙胺嗪(海群生)可以提高尿中微丝蚴的检出率。推荐三重浓缩技术回收微丝蚴[1]。也可以用膜过滤技术检出尿中的微丝蚴[1]。尿样本离心后可浓集埃及血吸虫卵，膜过滤技术对于虫卵的检出同样有效[1]。新鲜样本或福尔马林固定的样本应防止样本中虫卵的孵化。

在尿沉渣中也可发现肠道微孢子虫。这种病原主要引起肠道的感染，但对于免疫功能低下的人群，也可以播散到肾。

(四)呼吸道标本

痰(咳出或诱导的)、支气管肺泡灌洗液和气管分泌物可以用来进行寄生虫的检测[1,24]。痰中检测到的病原可以引起肺炎、局限性肺炎或Loeffler综合征，病原包括蛔虫、钩虫、粪类圆线虫的移行幼虫，并殖吸虫卵、细粒棘球绦虫，溶组织内阿米巴、齿龈内阿米巴、口腔毛滴虫滋养体和隐孢子虫卵囊，可能还有微孢子虫。并殖吸虫感染的患者痰黏稠，虫卵聚集形成褐色斑点(“铁屑”)，并可能带有血丝。痰通常进行湿涂片检查(加生理盐水和碘)，使用低或高倍镜观察(×100和×400)。样本在制备涂片前可以先浓缩。如果样本黏稠，可加入黏痰溶解剂等体积3%的NaOH(或未稀释的含氯的漂白剂)与样本彻底混合，然后500×g离心5 min。如查找痰中是否有溶组织内阿米巴或口腔毛滴虫，则不应该加入NaOH。离心后，弃上清，沉淀加生理盐水和碘进行涂片。如果由于某些原因导致检测延迟，应该加5%或10%的福尔马林固定痰，保存蠕虫卵或幼虫，或用PVA固定，并染色，便于原虫的检测。

(五)抽吸物

当常规检测方法未能检出病原时，抽吸物检测对于寄生虫感染的诊断很有价值。样本采集后应立即送到实验室。抽吸物包括从可能发现病原的身体各部位采集的液体样本。寄生虫实验室最常见的抽吸物包括细针抽吸液和十二指肠抽吸液。

细针抽吸物可以制备涂片、培养和(或)分子检测。对于阿米巴囊肿和脓肿的抽吸物需要离心浓缩、消化、直接涂片镜检寻找活动的病原，或培养后染色镜检。抗原检测和PCR检测也是可用的方法，由实验室自行选择。

对利什曼原虫无鞭毛体、克氏锥虫的无鞭毛体或疟原虫感染的骨髓穿刺物需要进行吉姆萨染色或对血液和组织进行其他染色。常规血膜涂片漏检的样本经过这样的检测可以确认感染。在某些情况下，培养、抗原的免疫学或PCR检测也可提供更敏感的结果[24]。

(六)活检标本

活检标本用于显微镜检查组织中的寄生虫(表136-5)。从皮肤、肌肉、角膜、肠、肝、肺和脑来源的病理组织按照标准组织准备工作，进行捣碎、挤压和印片，然后进行镜检。制备永久切片或电子显微镜检测的组织，应按实验室规定的流程进行组织的固定。在某些特定的病例中，对疑

似寄生虫感染的病例，活检标本可能是唯一的确诊方法。作为新鲜材料而不是制备切片的样本，应该浸泡在生理盐水中保持湿润，并尽快送至实验室。

组织中寄生虫的检测，一部分取决于标本收集，需要足够的材料去开展相关的检测以确诊。活检标本通常很小，且可能并不代表病变组织。多份组织样品可以提高诊断的准确性。为了优化组织标本的得率，所有区域都得检查，越多越好。活检组织的获取是个侵袭性过程，价格昂贵且耗时长，因此这些标本应该得到尽可能全面的检查。

组织应装在无菌生理盐水的无菌容器中，或者蘸有生理盐水的无菌海绵上进行提交。提交的组织做完直接检测和印压染色后，也可用于培养或者做原虫的分子检测。转运的材料应该避免细菌的污染。如果需要进行寄生虫的培养，用于涂片的玻片也应该是无菌的。

(七)血液

根据生活史，无论是全血、白细胞层、血沉棕黄层或各种类型的血层样本，均可能收集到很多寄生虫[1]。虽然有些原虫在新鲜的全血中能够运动，样本的鉴定通常是通过检查永久染色的厚血膜或薄血膜来完成。制作血膜的血液来自未抗凝或抗凝的新鲜全血，以及从各种血层来源的沉淀。推荐吉姆萨染色，但瑞氏染色或瑞氏吉姆萨染色也能检测到血液中的寄生虫。Delafield 苏木素通常用于微丝蚴鞘的染色。在某些情况下，吉姆萨染色没有很好的染色质量来分辨微丝蚴，然而，其他特征(如大小、核的分布)可用于鉴定。

1. 薄血膜 任何在薄血膜中检测寄生虫病原体的检查，最初都得从低倍镜(×100)开始实施。如果不能检测整个薄血膜，微丝蚴可能会被遗漏。微丝蚴很少大量出现，每个薄血膜中往往只有几个微丝蚴。微丝蚴通常在薄血膜的边缘或羽状边缘出现，因为做涂片时把它们带到这些位置。血膜的羽状边缘中血球是单层独立分布，应在疟疾和锥虫检测中应用。在这些区域中，感染的红细胞形态和大小最清晰可见。

依靠培训和镜检者的经验，在放大 1000 倍时检查薄血膜需要花 15～20 min(≥300 个油镜视野)。尽管一些学者用 50 或 60 倍的油浸物镜检测染色血膜，但有人担心比起传统的 1000 倍放大倍数，在较低的放大倍数(500 或 600 倍)下检查，一些小寄生虫如恶性疟、巴贝氏虫、利什曼原虫会被遗漏。因为人们倾向于以不同的速度扫描血膜，所以至少要检查 300 个油镜视野。如果在厚膜中看到了可疑的东西，那么在薄膜上检测的视野数往往远远大于 300 个。薄血膜的检测要求应该被作为一个固定的流程，所有结果(无论阴性还是阳性)尽快电话告知临床医生。如果检测结果是阳性，应根据条例或法律在合理的时间内通知合适的政府公共卫生部门(地方、州和联邦)。

疟疾和巴贝氏虫的感染被自动分辨的仪器漏检，导致这些病例治疗延迟。虽然这些仪器不是设计用来检测细胞内的血液寄生虫，自动检测系统无法区分未感染的红细胞和感染的红细胞，会引起严重的诊断问题[25]。现代血液分析仪基于流式细胞仪原理，结合多种参数转化成一个算法，可以提示存在细胞内寄生虫。阳性指标会提醒工作人员仔细检查血液涂片上是否存在微生物[26]。

2. 厚血膜 制备厚血膜的过程中，浓度最高的血细胞集中于血膜中央。在低倍镜下检测更容易发现微丝蚴。检测厚血膜通常需要 5～10 min (大约 300 个油镜视野)。寻找疟原虫和锥虫最好在放大倍数为 100 倍的油浸物镜下进行。完整的红细胞经常出现在厚血膜的周边，这些细胞如果被感染，对疟疾诊断很有用，因为它们能呈现出特征性的形态学特点，有利于微生物的种属鉴定。

3. 血液染色 为了准确鉴定血液寄生虫，实验室熟练运用至少一种有效的染色方法。最好选择一种能提供可重复结果的方法，比用几个不能确定结果的方法更好。血片应尽快染色，保存时间过长会导致染色背景较深。疟原虫阳性血片的染色延迟可能会导致无法显示原虫独特种属的染色特征。

最常见的染色有 2 种。瑞氏染色(或瑞氏-吉姆萨)有固定剂结合的染色方案，使得固定和染色同时进行，因此该方法不适用于厚血膜染色。在吉姆萨染色中，固定和染色是分开的，因此，薄血膜需在染色前用无水甲醇固定。

4. 血沉棕黄层 锥虫、偶尔组织胞浆菌(一种呈小椭圆形酵母细胞的真菌，与利什曼原虫无鞭毛体期相似)，以及在免疫抑制患者潜在的刚地弓形虫和利什曼原虫感染(婴儿利什曼原虫、恰加斯

利什曼原虫和杜氏利什曼原虫），会在血沉棕黄层（抗凝全血离心后获得的一层白细胞）里的大单核细胞中检测。利什曼原虫无鞭毛体具有动基体，核染色为暗紫红色，细胞质染色为亮蓝色。组织胞浆菌显示出大块核物质（暗紫红色）被一个清晰的光环区包围着。外周血的锥虫同样集中在血沉棕黄层[1]。

5. 筛选方法 血沉棕黄层定量分析法（quantitative buffy coat，QBC）进行微量血细胞比容离心检测疟疾，玻璃毛细管，管的一端有密封的塑料帽子（QBC 疟疾采血管；Becton Dickinson，热带疾病诊断，Sparks，MD），已被用于血液寄生虫检测。吖啶橙预包被的管子，能诱发寄生虫产生荧光。用 QBC 管采集 50～60 μl 的毛细管或静脉血，14 387×g 离心 5 min。寄生虫或感染的红细胞离心至距红细胞柱顶部 1～2 mm 的区域，被塑料浮球紧密压在管壁，使它们容易在荧光显微镜下观察。这个方法自动制备了一个浓缩涂片，呈现在浮球与管壁之间。一旦管子放进塑料套管中（观察寄生虫专用），血细胞比容管顶端浸油（不需要盖玻片），在 40～60 倍油镜下检测（工作距离必须 0.3 mm 或更大）[1]。设备的成本和专业人员的技术水平可能限制这个技术的使用。

6. 血液寄生虫的抗原和 DNA 检测 几种抗原检测试验是可行的，其中许多都是为快速和个体诊断所设计。大多数的试剂盒在美国没有，但在其他国家被证明很有用[27]。快速试验对疟疾种属水平的诊断，尤其是恶性疟都很有效。这种检测易于实施，在需更耗时的开展厚、薄血膜镜检的同时也可应用这类方法，但必须意识到会出现假阴性和假阳性[28-31]。一般推荐这些方法只能作为厚、薄血膜镜检的辅助诊断。许多文献中报道了各种分子学检测方法（例如，PCR、DNA/RNA 杂交和测序）。虽然这些方法比标准的血片镜检更加敏感，但在疟疾诊断中并不常用。

7. 诺特（Knott）浓集 诺特浓集的方法主要用于检测血中的微丝蚴，尤其是当怀疑轻度感染的时候。在抗凝血中加入福尔马林水溶液，300×g 离心微丝蚴，沉淀在光镜下进行检测（放大倍数为×100 和×400 倍）。剩余沉淀可以做成厚血膜。微丝蚴在湿片中不会动，然而，在染色时能呈现出形态学诊断特征。这个方法的缺点是微丝蚴被福尔马林杀死，因此看不见运动的病原。

8. 膜过滤技术 膜过滤技术[25mm 核孔滤器（5μm 孔径）]已被证明在鉴定低密度微丝蚴感染时非常有效。在实地调查中同样有效[1]。

（八）培养方法

很少有临床实验室能提供特定的寄生虫培养技术。体外培养往往很复杂，质量控制困难，在常规的诊断实验室并不可行。在特定的研究所，有些技术可能是可行的，尤其是提供咨询服务和研究目的的研究机构。

很少有寄生虫能够常规培养，有常规培养方法的是溶组织内阿米巴、福氏阿米巴、棘阿米巴、阴道毛滴虫、刚地弓形虫、克氏锥虫、脑炎小孢子虫和利什曼原虫。这些方法只有在咨询过实验室，在特定的需求下才能培养。商业化的检测试剂只能检测阴道毛滴虫（InPouch TV；BioMed Diagnostics，White City，OR）。

（九）动物接种与异种诊断

大多数常规的临床实验室没有动物饲养设施，无法提供动物接种的方法来诊断寄生虫感染。众所周知许多动物寄生虫种属有宿主特异性，限制了感染动物的种类。虽然动物接种不能代替其他常规方法，但在某些疑似感染中，可以要求进行动物接种，这对于明确诊断很有帮助。小鼠羊水接种过去用于先天性弓形虫的诊断，如今这个方法已被核酸扩增检测所替代。

异种诊断是一种用节肢动物宿主作为感染指标的技术。未感染的猎蝽科的昆虫，吸取疑似恰加斯病（克氏锥虫）患者的血液。30～60 天后，在 3 个月的时间内持续对昆虫的排泄物进行检测，包括媒介的后肠中是否存在发育阶段的寄生虫。此类方法主要在南美用于野外工作，出于此目的，这种昆虫在各个实验室进行适量的培养。

（十）抗原检测

检测寄生虫特异性抗原是现症感染的指标。免疫检测普遍易行。有些方法允许同时开展大量样本的检测，因而降低总成本。其他的则是为快速个体诊断而特别设计的。抗原检测最主要的缺点是大多病例中，该方法一次只能检测一种病原。因此，必须开展其他寄生虫检测来检查其他寄生虫病原。目前，与常规镜检相比，商业化的检测肠

道原虫的免疫试剂有极好的敏感性和特异性[31-34]。使用免疫检测和常规寄生虫/虫卵检查的方法排序列在表 136-6 中。疟疾诊断的快速检测应作为镜检厚、薄血膜的平行试验。

(十一)寄生虫的核酸检测

分子检测更适用于实验室诊断。已有用于阴道毛滴虫、溶组织阿米巴、溶组织内阿米巴复合群、贾第虫属和隐孢子虫的商业化检测试剂，并已通过 FDA 认证。胃肠道检测试剂能同时检测多种胃肠道病原体，包括细菌、病毒和寄生虫。与抗原检测一样，只有目标病原能被检测，其他病原可能被遗漏。特定自动化检测的病原在第 138 章列出。另外的病原，如囊芽原虫、脆弱双核阿米巴、微孢子虫和粪类原线虫的分子检测试剂正在研制中。

表 136-6　粪便寄生虫的检查方法：检测顺序[a]

患者和(或)状态	检测顺序	后续试验要求
腹泻的患者合并艾滋病或其他原因导致的免疫缺陷 来自于地方供水引起的潜在的水源暴发	隐孢子虫或贾第虫/隐孢子虫免疫检测[b,c](表 136-2)，或者核酸扩增	如果免疫检测或者核酸扩增为阴性，并且症状持续，需要开展微孢子(改良三色染色)和球虫(改良抗酸染色)和虫卵/寄生虫的特异性检测
腹泻的患者(来自幼儿园、托儿所、露营者或背包客) 来自美国贾第虫流行区的患者	贾第虫或贾第虫/隐孢子虫免疫检测[b,c]，或者核酸扩增	如果免疫检测或核酸扩增为阴性，并且症状持续，需要开展微孢子、球虫和虫卵/寄生虫的特异性检测
腹泻并有相关的旅游史的患者 腹泻的患者，过去或现在住在发展中国家 来自美国除贾第虫外其他寄生虫流行区的患者	虫卵/寄生虫的检测，溶组织阿米巴的免疫学检测，隐孢子虫或贾第虫/隐孢子虫免疫学检测或核酸扩增[b,c]，粪类圆线虫检测(即使缺乏嗜酸性粒细胞)	如果虫卵/寄生虫检测为阴性，并且症状持续，需要开展球虫和微孢子的特异性检测
过去或现在住在发展中国家的腹泻患者；来自美国除贾第虫外其他寄生虫流行区的患者 不明原因的嗜酸性粒细胞增多症的患者(低度或高度)，有或没有腹泻；可能是免疫功能缺陷，或经常使用激素的患者；超级感染或严重腹泻的患者[症状包括肺炎、脓毒血症和(或)脑膜炎]	虫卵/寄生虫的检测，重点是蠕虫的检测(未固定的粪便，采用沉淀/浮聚技术)；非常重要的是，明确粪类圆线虫感染已经排除-特别是免疫缺陷的患者或免疫抑制剂治疗的患者等。(未固定的粪便，巴门浓集试验或琼脂平板培养)	如果虫卵/寄生虫检测是阴性，推荐琼脂平板进行粪类圆线虫的培养，特别是病史提示可能是这种感染。特异性抗体的血清学试验是可供选择的其他诊断方法
腹泻的患者(疑为食源性疾病暴发)	卡耶塔环孢子虫检测(改良的抗酸染色，自发性荧光)	如果检测为阴性，并且症状持续，需要开展微孢子虫、其他球虫和虫卵/寄生虫特异性检测

注：[a] 从文献[1]中修改。[b] 依赖于特异的免疫检测试剂盒或使用过的检测方案，包括单一或多种病原的检测。特异的检测试剂盒的选择依赖于多种因素如临床的相关性、价格、操作的难易度、培训、人员的可用性、检测的次数、医生的培训、敏感性、特异性、设备和出结果的时间。很少有实验室以完全相同的方式处理这种类型的测试。许多选择是临床相关的，患者家属也可以接受的。[c] 2 次粪便样本应该用免疫学实验进行检测以排除贾第虫感染，低虫荷的粪便样本免疫学检测也可能为阴性

表 136-7　粪便固定剂：利和弊

粪便保存	利	弊
福尔马林	良好的粪便浓缩固定剂。易于制备，保质期长。浓缩的沉淀可用于不同的染色方法[a]，但不能进行所有的免疫学检测(表 136-2)	不能很好地保存滋养体。对于永久染色的涂片不能完全保存病原的形态；对于所有的免疫学检测不是最优的选择；不适用于分子学诊断(如 PCR)
SAF	可用于浓缩和永久染色的涂片不含汞化合物。易于制备，保质期长。浓缩沉淀可用于大部分新的免疫学检测方法和特殊染色	黏附性能不佳；推荐白蛋白包被玻片。对于永久染色的涂片，如果配合铁苏木素染色，原虫的形态会保存的较好(三色染色法效果就没有这么好)。操作上较难；然而，这不是真正的限制因素。不适合分子学诊断

（续　表）

粪便保存	利	弊
绍丁液(含汞)	用于固定新鲜的粪便样本或来自肠黏膜表面的样本。对于原虫的滋养体和包囊有良好的固定效果	对于浓缩试验一般不推荐。含有氯化汞;会导致沉淀。对于液体或黏膜样本黏附效果不佳
PVA(含汞)	可用于永久染色涂片和浓缩技术的固定(少见)。对原虫的滋养体和卵囊提供很好的固定效果。样本可被转运到实验室进行后续的检测;处理后病原的形态保存较好。适于核酸扩增。在对其他所有固定剂进行评价后,这个配方被认为是永久染色后病原形态的保存金标准	毛首鞭形线虫卵和贾第虫包囊不如福尔马林固定剂处理后那样易于被浓缩。粪类圆线虫幼虫形态不佳(福尔马林固定剂效果要好些)。贝氏囊孢子虫卵囊用 PVA 固定剂固定后不可见(福尔马林固定效果好)。含有汞化合物,并且会导致化学废物丢弃的问题。当它开始脱水或冷藏时可能变白并且呈凝胶状。在实验室难以制备。样本中含有 PVA,不能用于免疫方法检测
改良的 PVA(含铜或锌)	可用于永久染色的涂片和浓缩技术的固定(少见)。许多技术人员相比于硫酸铜,更愿意使用锌的替代物,不含汞化合物	相较于含氯化汞的固定剂,用改良的 PVA 固定,原虫滋养体和包囊形态都不佳。使用锌的替代品效果稍有改善。原虫染色特征不一致,有些好,有些不好。病原的鉴定,尤其是小原虫包囊(微小内蜓阿米巴)比较困难
单瓶系统(含或不含 PVA)	可用于永久染色的涂片和浓缩技术的固定。可进行免疫学检测。可不含福尔马林或汞化合物。除非病原数量少,可进行病原数量收集和鉴定。识别病原需要进一步的培训,因为整个病原的形态与含汞固定剂固定的不可比较 浓缩、永久染色、一些免疫学实验和分子生物学检测可以开展	整个原虫滋养体和包囊的形态不如含氯化汞固定剂固定的病原,与改良的 PVA 固定效果相似。对原虫的染色效果不一致;有些好,有些不好。鉴定微小内蜓阿米巴包囊比较困难。可能需要额外的培训来识别这些微生物,因为它们的整体形态与含汞固定剂固定的样本无法相比。并不是所有的免疫检测都可以使用这些固定剂的粪便标本。然而,尽管有这些缺点,单瓶系统正越来越广泛地应用于浓缩的、永久染色涂片和粪便免疫检测

注:[a] 改良抗酸染色和改良三色染色

以核酸为基础的检测(具有高效性和 DNA 特异性扩增的固有潜能)几乎已应用到所有种属的寄生虫,但只有一小部分作为常规诊断方法。主要原因是,很多寄生虫在发育阶段可以用已建立的传统方法检出(镜检、抗原抗体测抗、体外培养),这些方法便宜且技术要求比核酸扩增低。因此,在传统方法不足以诊断的病例中,核酸扩增诊断就很有价值,包括:①免疫反应没有形成(如急性感染、治疗后短期随访、先天性感染);②虫荷低需高敏感性检测方法(例如,皮肤利什曼病);③借助于形态无法区分的病原需要鉴定(溶组织内阿米巴/迪斯帕内阿米巴和绦虫卵)。

当有简便且完全标准化的核酸扩增商业试剂盒可购买,且通过自动化核酸扩增前后步骤的自动化使成本降低时,核酸扩增诊断技术可能会得到更广泛的应用。此外,它不仅能够检测和鉴定,同时能定量,通过分析核酸扩增的产物进行基因型鉴定。实际上对基因特征性的核酸扩增已经广泛应用在解决寄生虫学问题中,如宿主范围、宿主特异性、传播途径和分子流行性。如基因分型的应用在未来会增加人们对寄生虫基因变异和毒性特征或药物抗性之间关系的认识。核酸扩增诊断的一个重要限制是材料在福尔马林中保存超过 1 天后敏感性大大降低,因为 DNA 碎片化(片段长度为几百个碱基对)。然而,通过选择扩增的引物使产物应尽可能短,敏感性可能会相当高。因此,如果考虑核酸扩增检测,样品不宜用福尔马林保存。这样的检测也不适合广泛应用于寄生虫学。

附录

寄生虫成像

寄生虫成像库和寄生虫资源(2017. 10. 5 访问过)

特拉华大学(http://www.udel.edu/mls/dlehman/medt372/index.html)

疾病预防控制中心(http://www.cdc.gov/dpdx)

俄勒冈州公共卫生实验室寄生虫图像库(http://public.health.oregon.gov/LaboratoryServices/ImageLibrary/Pages/parlib.aspx)

美国寄生虫学家社会(http://amsocparasit.org/parasite-images)

寄生虫学信息(2017. 10. 5 访问过)

疾病预防控制中心(http://www.cdc.gov/

dpdx/az. html)

世界卫生组织(http://www. who. int)

医学化学公司(http://www. med-chem. com)

NCBI 国家医学数据库(PubMed)(http://www. ncbi. nlm. nih. gov/entrez/query. fcgi)

美国空军公共卫生信息和资源(http://www. phsource. us)

人类肠道原生动物图谱(http://www. atlas-protozoa. com)

瑞士热带和公共卫生研究所(http://www. parasite-diagnosis. ch/home)

参考文献请扫二维码查阅

第137章 试剂、染色和培养基：寄生虫学

ANDREA J. LINSCOTT，SUSAN E. SHARP

（马莹 译；胡媛、曹建平 审校）

在临床实验室中，对临床标本中虫卵和寄生虫的检查会涉及对标本的直接肉眼观察、对新鲜和保存的标本进行显微镜检查及对一些寄生虫进行培养。这些检查需要使用各种染色剂、试剂和培养基。本章对最常用的染色剂、试剂和培养基进行讨论。

由于很多寄生虫不能培养，因此显微镜检查是诊断寄生虫学最主要的方法。对新鲜和未浓集标本进行熟练的染色，以及对防腐保存和（或）浓集标本进行永久染色后镜检，通常可以做出快速和准确的诊断。许多试剂和染色剂都可达到以上目的，每个实验室必须确定使用哪些方法以最好地服务于患者。此外，因为大多数标本在送检时加入了固定剂和防腐剂，检验人员应注意聚乙烯醇（PVA）和含汞试剂对常用于寄生虫诊断的免疫学检测产生的特定干扰。由于免疫学检测和核酸扩增检测越来越普遍地应用于寄生虫检查中，因此必须考虑到这些试验所用到的试剂。

在寄生虫实验室使用试剂时要特别注意，如果处理不当，许多常规使用的化合物会变得危险。例如，甲醛溶液（福尔马林）可引起严重的皮肤刺激，如果吞食，可引起剧烈的呕吐和腹泻；汞化合物是局部刺激物和全身性毒物，可通过皮肤吸收；苯酚有皮肤刺激性，大量暴露会影响中枢神经系统；二甲苯可引起严重的皮肤刺激，持续暴露会引起胃肠道、神经系统和组织损伤[1]。谨记含福尔马林和（或）汞的试剂需要特殊处置。应遵照州和联邦管理指南执行正确处置。

一、试剂

下面所有的试剂均为防腐剂和（或）固定剂。表137-1列出了几种防腐剂及其成分、可进行的特定永久染色涂片、可用于免疫学检测及关于固定剂的其他说明。如今，大多数实验室会购买防腐剂和固定剂/黏合剂的预混合包装瓶，这种包装瓶既可以盛放粪便标本运送到实验室，也可以让患者拿回家自己留取标本。表137-2列出了一些商业化的运输瓶。

表137-1 诊断寄生虫学使用的防腐剂（肠道标本）

防腐剂	用途		
	浓集检查	永久染色涂片	免疫检测[a]
5%或10%福尔马林	是	否	是（EIA，FA，快速）
5%或10%福尔马林缓冲液	是	否	是（EIA，FA，快速）
MIF	是	Polychrome Ⅳ染色[b]	否（无免疫检测系统的公开资料）
SAF	是	铁苏木素染色 三色染色（效果不好）	是（EIA，FA，快速）
Hg-PVA[c]	是	三色染色或铁苏木素染色	否（PVA塑性粉末干扰免疫检测）
Cu-PVA[d]	是	三色染色或铁苏木素染色	否（PVA塑性粉末干扰免疫检测）
Zn-PVA[e]	是	三色染色或铁苏木素染色	部分，并非全部；PVA塑性粉末干扰免疫检测

（续 表）

防腐剂	用途		
	浓集检查	永久染色涂片	免疫检测[a]
单瓶系统[f]	是	三色染色或铁苏木素染色	部分，并非全部。如果不含 PVA 或汞，可能适用于粪便样本的免疫检测
绍丁液（不含 PVA）[c]	否	三色染色或铁苏木素染色	否（汞干扰免疫检测）

注：[a] EIA. 酶免疫分析；FA. 荧光分析。[b] 这种染色可代替三色染色法对用 MIF、PVA 或 SAF 防腐的粪便涂片进行染色，有市售产品。[c] 使用其他固定剂的标本永久染色后对生物形态进行评估，这样的评估后，PVA（作为“胶水”将粪便黏附于玻片的塑性粉末/本身无固定作用）和绍丁固定剂（氯化汞为基础）仍被认为是金标准。用无氯化汞化合物制备的其他固定剂正在研制和检测。[d] 此改良使用硫酸铜而不是氯化汞。[e] 此改良使用锌剂而不是氯化汞，在三色染色和铁苏木素染色中效果明显很好。[f] 此改良是多种成分（含锌）的组合，但使用专有配方制备。目的是提供一种用于粪便浓集和永久涂片染色的固定剂。十二指肠贾第虫和隐孢子虫的免疫检测对此固定剂的接受性是不同的，因此要确保按照厂家说明书来正确使用。溶组织内阿米巴和（或）溶组织内阿米巴/迪斯帕内阿米巴群的检测仍需要新鲜或冷冻标本

表 137-2 用于寄生虫检测的商业化标本采集/运输瓶[a]

公司	防腐剂	固定剂	单瓶系统
Alpha-Tec Systems（http://www.alphatecsystems.com; accessed8/5/17）	10%福尔马林	SAF Zn-PVA	Proto-fix CLR
Medical Chemical Corporation（http://www.med-chem.com/, accessed8/5/17）	10%福尔马林 MIF	Cu-PVA LV-PVA Zn-PVA SAF	Total-Fix universal fixative（无汞、福尔马林或 PVA）
Meridian Bioscience（http://www.meridianbioscience.com/, accessed8/5/17）	10%福尔马林	LV-PVA SAF Zn-PVA	EcoFixuniversal fixative（无汞或福尔马林，含 PVA）
Remel（http://www.remel.com; accessed 8/5/17）	5%福尔马林 10%福尔马林	PVA SAF Zn-PVA	
Scientific Device Laboratory（http://www.scientificdevice.com; accessed8/5/17）		PVA SAF	Parasafe
VWR（http://VWR.com; accessed 8/5/17）			Alcorfix

注：[a] LV-PVA. 低速聚乙烯醇。网站访问日期为月/日/年格式

（一）福尔马林制剂

1. 福尔马林 福尔马林是寄生虫学浓集操作中的一种通用防腐剂。然而，由于福尔马林不能充分保持生物的形态，因此不能用于制备永久染色的涂片[2]。福尔马林制备简单，储存期长，是粪便和十二指肠引流液标本最常规使用的防腐剂。福尔马林可以完好地保存蠕虫虫卵、幼虫，以及原虫包囊、卵囊和孢子的形态，但不能很好地保存原虫的滋养体。虽然目前 5%和 10%的福尔马林溶液均在使用（5%能最佳地保存原虫各阶段，10%用于保存虫卵和幼虫），但现在 10%的配方在临床寄生虫学中使用最为广泛。一小瓶福尔马林通常搭配一小瓶固定剂，如 PVA 或绍丁液，以确保能够制备永久染色涂片并镜检。福尔马林（10%）制备方法如下：

甲醛（37%～40%的甲醛溶液） …… 100 ml

生理盐水（0.85% NaCl）或蒸馏水 …… 900 ml

2. 福尔马林缓冲液 福尔马林与钠和钾的磷酸盐缓冲液可用于长期保持寄生虫的形态及用于浓集操作。为制备福尔马林缓冲液，将以下干燥原料混合并保存于一个密闭容器中。将 0.8 g 此混合物加入 1 L 10%（或 5%）的福尔马林中。

磷酸氢二钠（Na_2HPO_4）………………… 6.1 g

磷酸二氢钾（KH_2PO_4）………………… 0.15 g

3. 硫柳汞-碘-福尔马林（MIF） 粪便和十二指肠引流液标本在 MIF 中固定后，可直接在湿片中鉴定原虫、蠕虫虫卵及幼虫。MIF 不仅能够

固定，还可用于生物染色。MIF 也可用于浓集操作。此方法要求在使用前一刻将以下列出的 2 种储存液混合成为新鲜的工作液。另外，样本和 MIF 混合后必须静置 24 h，静置后形成 3 层，取下面 2 层制备涂片。放置于 MIF 中的样本在防腐后的数周内均可进行寄生虫学检查，这使其在野外调查中非常有用。MIF 也容易买到商业化试剂。

溶液Ⅰ（储存于棕色瓶）

蒸馏水 …… 50 ml

甲醛 …… 5 ml

硫柳汞（硫柳汞酊，1∶1000） …… 40 ml

甘油 …… 1 ml

溶液Ⅱ（卢戈液）（可在密封棕色瓶中保存数周）

蒸馏水 …… 100 ml

碘化钾晶体（KI） …… 10 g

碘晶体（KI 溶解后加入） …… 5 g

使用前将 9.4 ml 溶液Ⅰ与 0.6 ml 溶液Ⅱ混合。

(二)含聚乙烯醇的防腐剂和固定剂

聚乙烯醇作为一种粪便黏附剂，使粪便黏附于玻片上。有多种商业化改良试剂。与聚乙烯醇共同使用的化合物，特别是氯化汞、硫酸锌或硫酸铜，充当了防腐剂，并使三色或铁苏木素染色的永久涂片中的原虫包囊和滋养体得到固定。所有含 PVA 的防腐剂均会干扰免疫检测。PVA 不适用于粪便样本浓集，它需要与另外一种试剂[福尔马林、MIF、或乙酸钠-醋酸-福尔马林（SAF）]配对使用才能用于浓集。

1. 汞-聚乙烯醇（Hg-PVA）　汞-聚乙烯醇固定剂使用氯化汞作为防腐剂。含有 PVA 的汞化合物能最佳地保持原虫形态。但是，由于汞化合物的毒性及制备困难，多数实验室不再制备 Hg-PVA。

2. 锌-聚乙烯醇（Zn-PVA）　锌-聚乙烯醇固定剂使用硫酸锌代替汞作为原虫的防腐剂和固定剂。经 Zn-PVA 处理的样本也可用于永久涂片的三色染色或铁苏木素染色。

3. 铜-聚乙烯醇（Cu-PVA）　铜-聚乙烯醇固定剂使用硫酸铜代替汞作为原虫的防腐剂和固定剂。经 Cu-PVA 处理的样本也可用于永久涂片的三色染色或铁苏木素染色。

有研究表明，在永久染色中，用硫酸锌代替汞的效果差强人意，而硫酸铜在保持形态方面不如氯化汞[3-4]。

(三)绍丁固定液

绍丁液是一种由氯化汞、蒸馏水和 95% 乙醇配制而成的固定液，能很好地保持原虫形态。这种溶液主要用于新鲜、非保存标本制备永久染色涂片以进行寄生虫学检查。经绍丁液固定的样本可用于三色染色或铁苏木素染色。与 Hg-PVA 一样，由于汞化合物的毒性及制备困难，临床微生物实验室不会常规制备绍丁液。另外，商业化的绍丁固定液也越来越难买到。许多实验室选择使用可同时用于浓集和制备永久染色涂片的无汞或低汞的单瓶系统。“无汞或低汞，非福尔马林固定液：单瓶系统”见下文。

(四)乙酸钠-醋酸-福尔马林（SAF）

SAF 与福尔马林相似，是一种液体固定剂且无汞。但不同于福尔马林的是，SAF 可用于浓集和永久染色涂片。浓集后的沉渣既可用于制备湿片，也可用于永久染色。白蛋白包被的玻片可使浓集后的样本更好地黏附其上，推荐和 SAF 共同使用。用 SAF 代替 PVA 或绍丁液用于永久涂片的三色染色或铁苏木素染色是可接受的。SAF 有商业化产品且储存期长，也可在实验室中通过混合以下试剂来配制：

乙酸钠 …… 1.5 g

冰乙酸 …… 2.0 ml

甲醛（37%～40%甲醛溶液） …… 4.0 ml

蒸馏水 …… 92.0 ml

(五)无汞或低汞，非福尔马林固定剂：单瓶系统

有多种无汞、非福尔马林的商业化专有固定剂，用于粪便样本浓集和制备永久染色涂片（Medical Chemical Corporation，Torrance，CA；Meridian Bioscience，Cincinnati，OH）。也有同样用于以上所述用途的低汞、非福尔马林的专有固定剂（Alpha-Tec，Vancouver，WA）。另一个无福尔马林的单样收集装置是 Alcortix，它与一个 Mini Parasep 的无溶剂收集管共同使用用于标本浓集。Alcortix 已经经过评估并在一些大的

参考实验室使用[5]。这个产品由 Apacor 生产(Berkshire，英国)，在美国由 VWR 经销。这些系统的亮点在于只需一个小瓶即可同时制备浓集标本和永久染色涂片，且这些小瓶可与实验室其他生物危害垃圾一起丢弃。在粪便免疫检测中对这些固定剂的接受性会有不同(特定使用时需与生产商进行确认)。某些上述固定剂也可用于特殊染色。

二、染色

表 137-3 列出了寄生虫检测和有助于鉴定的常用染色法。图 137-1 至图 137-5 示例了使用下述各种染色法时寄生虫的染色特性。寄生虫学中使用的染色法的说明和操作见下文。表 137-4 列出了商业化的寄生虫学染色剂。

表 137-3 用于寄生虫鉴定的染色法

寄生虫	用于检测的染色法
隐孢子虫属、贝氏囊等孢子虫、卡耶塔环孢子虫	改良抗酸染色(图 137-1)(译者注：应为图 137-5)
囊等孢虫和环孢子虫卵囊、肉孢子虫孢子囊	无需染色，荧光显微镜观察自身荧光(图 137-2)(译者注：应为图 137-1)
环孢子虫	改良番红染色
耐格里属，棘阿米巴属，巴拉姆希属	用荧光显微镜观察的荧光增白剂染色，三色染色
棘阿米巴	改良 Field 染色，三色染色
血液寄生虫(疟疾的病原体、微丝蚴、利什曼原虫、巴贝虫、锥虫)	吉姆萨染色或瑞氏染色(也可用快速血片染色)(图 137-3)(译者注：应为图 137-2)
微丝蚴(特别是鞘膜和核)	Delafield 苏木素染色；吉姆萨染色也可接受，班氏吴策线虫除外
寄生蠕虫虫卵/幼虫和原虫包囊	碘染色(图 137-4)(译者注：应为图 137-3)
肠道寄生原虫	铁苏木素染色，三色染色(图 137-5)(译者注：应为图 137-4)

表 137-4 商业化的寄生虫检测染液

公司[a]	染液
Alpha-Tec Systems (http:// www.alphatecsystems.com，accessed8/5/17)	隐孢子虫染色试剂盒 吉姆萨染液和缓冲液 Proto-fix 染色试剂盒 Wheatley 三色染液
Hardy Diagnostics (http://hardydiagnostic.com，accessed 8/5/17)	吉姆萨染液和缓冲液 碘酒精染液 Wheatley 三色染液
Medical Chemical Corporation (http://www.med-chem.com，accessed8/5/17)	D'Antoni 碘液 铁苏木素染液 吉姆萨染液和缓冲液 Wheatley 改良 Gomori 三色染液
Meridian Bioscience (http:// www.meridianbioscience.com，accessed8/5/17)	EcoStain 三色染液
Remel (http://www.remel.com，accessed8/5/17)	三色染液 快速三色染液
Scientific Device Laboratory (http://www.scientificdevice.com，accessed8/5/17)	快速三色染液 隐孢子虫 Kinyoun 染液 三色染液

注：[a]. 网站访问日期为月/日/年格式

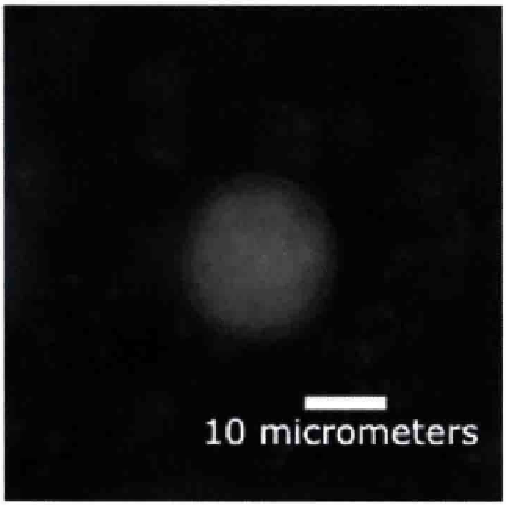


图 137-1 紫外显微镜下观察环孢子虫卵囊的自发荧光，见彩插

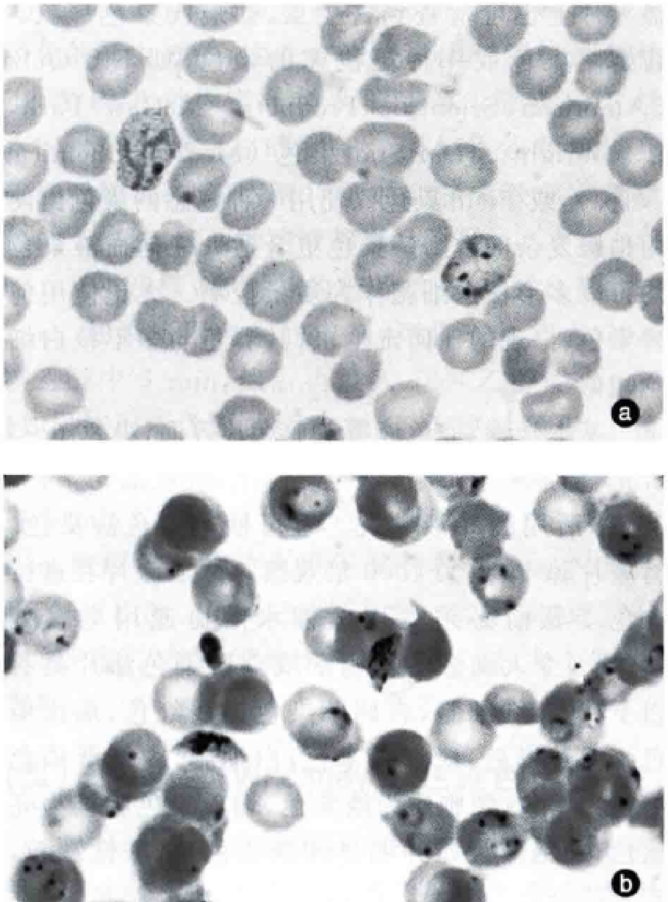


图 137-2 外周血涂片吉姆萨染色显示暗粉色薛氏小点(a)和环形滋养体 (b)外周血涂片吉姆萨染色下的配子体，见彩插

(一)碘染(卢戈碘液或 D'Antoni 碘液)

制备直接湿片或浓集湿片进行寄生虫学检查时可使用碘溶液。这些非特异性染色可将寄生虫



图 137-3 碘染的金棕色贾第虫包囊，见彩插

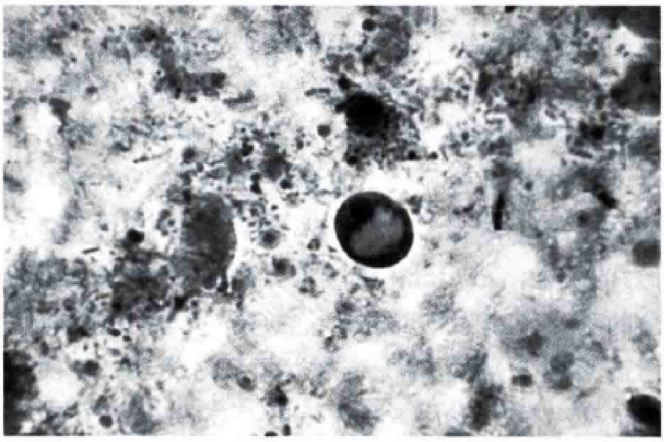


图 137-4 三色染色下蓝色的嗜碘阿米巴包囊，注意染色质核仁染成深蓝色而空泡染成浅蓝色，见彩插

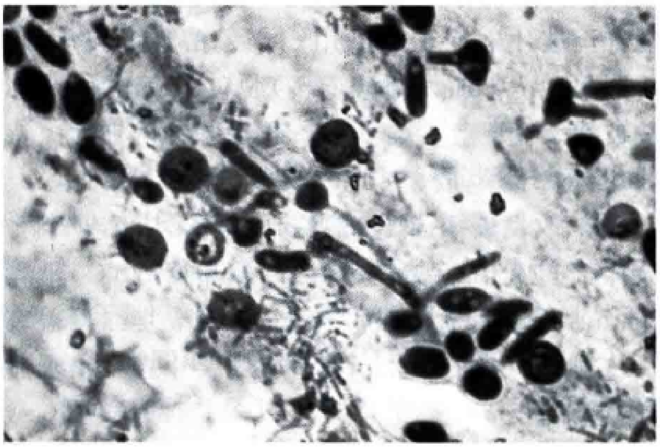


图 137-5 快速抗酸染色下染成鲜红色的隐孢子虫卵囊，细菌和真菌染为蓝色，见彩插

包囊与白细胞区分开，前者保留了碘而呈现浅棕色。碘易使虫卵过度着色，因此，应使用无碘的湿片来检查虫卵。可购买商业化碘染液用于常规寄生虫学检查。这些溶液应置于深色容器中避光保

存。D'Antoni 碘液的优点在于使用时无须进一步稀释，而卢戈碘液必须在使用前稀释成工作溶液(蒸馏水 1:5稀释)。2 种碘液的工作溶液会随时间褪色，当暗茶色变淡时应丢弃并更换。

基本步骤：滴 1 滴碘液于玻片上，加少量粪便标本并充分混匀。碘立即使粪便中的物质着色，此步骤所需时长不重要。在悬液上盖盖玻片，放大 100 倍观察，在 400 倍下观察可疑成分。

(二)抗酸染色(改良)

隐孢子虫、贝氏囊等孢子虫和卡耶塔环孢子虫是引起人类腹泻的寄生球虫。用改良抗酸染色更容易检测到这些寄生虫。对抗酸染色方法的改良是使用较分枝杆菌染色时稍弱的脱色剂。用于分枝杆菌染色的石炭酸复红和复染试剂(亚甲蓝)也可用于寄生球虫的染色，但是，脱色剂不可互换。在细菌的 Kinyoun 抗酸染色中使用的脱色剂为 3%的硫酸溶液，而在改良抗酸染色中，使用 1%的硫酸溶液(1 ml 硫酸加入 99 ml 水中)；在细菌的萋-尼(Ziehl-Neelsen)抗酸染色法中使用的脱色剂是用 95%乙醇配制的 3% HCl 溶液，而在改良抗酸染色中使用 5%的硫酸溶液(5 ml 浓硫酸加入 95 ml 蒸馏水中)。

1. 改良 Kinyoun 染色(冷法) 基本步骤(改良 Kinyoun 染色)：样本(1 滴或 2 滴)涂抹于玻片上，自然干燥，无水甲醇固定 1 min。滴加石炭酸复红至玻片染色 5 min，用 50%乙醇冲洗玻片，然后用水冲洗。加入硫酸(1%)脱色 2 min，用水冲洗玻片。亚甲蓝复染 1 min，再用水冲洗玻片。待玻片自然干燥，放大 100～1000 倍观察。

2. 改良萋-尼染色(热法) 样本(1 滴或 2 滴)涂抹于玻片上，自然干燥，然后加热器(70℃)干燥 5 min。将玻片置于玻片架上，石炭酸复红覆盖玻片。用酒精灯或本生灯缓和加热玻片直至出现蒸汽。染色 5 min，然后冲洗。用 5%硫酸脱色 30 s，冲洗。亚甲蓝复染 1 min，冲洗。待玻片自然干燥，放大 100～1000 倍观察。

(三)吉姆萨染色和瑞氏染色(用于血涂片染色)

血涂片的寄生虫检查常用 2 种染色为吉姆萨染色和瑞氏染色，两者均源于 Romanowsky 染色。2 种染色十分相似，差异主要在于吉姆萨染液中不含固定液，血膜在染色前必须用无水甲醇固定。一些疟疾感染中会出现点彩红细胞，只有在吉姆萨染色中才能看到[6]。虽然这些染色的储存液可在实验室中制备，但是制备过程非常烦琐，需用研钵和杵将粉状染色剂与甲醇和(或)丙三醇进行研磨，振摇存放数天至数周，倒出上清或过滤后使用。而且，建议用 pH 7.0～7.2 的磷酸盐缓冲液稀释染色储存液，每天新鲜配制吉姆萨染液[7]。或者，吉姆萨、瑞氏和瑞氏-吉姆萨染液均可通过供应商购买，仅需要用缓冲液稀释。血膜可以手工染色，但许多实验室用自动化血液学仪器对薄血涂片(而非厚血涂片)进行染色，也可获得可接受的结果。这些染色可检查血液寄生虫，包括疟疾、微丝蚴、利什曼原虫、巴贝虫及锥虫。尽管多年来，吉姆萨染色是染色的首选，但其他染色法，血涂片上也可检查到寄生虫，如瑞氏染色、瑞氏-吉姆萨染色或一种更快速的染色，如 Diff-Quik (American Scientific Products, McGaw Park, IL)、Wright's Dip Stat 染色 (Medical Chemical Corp.)，或 Field 染色。使用一种熟悉的染色比使用稍嫌复杂的吉姆萨染色更合适。任何血液染色均可以多形核白细胞作为质量控制。无论使用何种染色，出现的任何寄生虫，其着色与多形核白细胞相似。

基本步骤：染色液覆盖血涂片表面，染色 1～3 min，滴加等量的缓冲液至玻片上，轻吹混匀。4～8 min 后用缓冲液冲洗。也可使用染色缸染色。将玻片晾干，放大 1000 倍观察。厚血涂片在进行染色步骤前必须先用蒸馏水溶血或用皂素处理[8-9]。令人满意的吉姆萨或瑞氏染色涂片具有以下特点：红细胞，吉姆萨染色为浅红色，瑞氏染色为浅黄褐色、淡红或米色；白细胞，吉姆萨染色胞核为紫色，细胞质为淡紫色，瑞氏染色胞核为亮蓝色，细胞质为差异明显的淡蓝色；嗜酸性颗粒，吉姆萨染色为亮紫红色，瑞氏染色为亮红色；中性粒细胞颗粒，吉姆萨染色为深粉紫色，瑞氏染色为粉红或浅紫色。

(四)苏木素染色

1. Delafield 苏木素染色 Delafield 苏木素染色用于薄血涂片和浓集血涂片的微丝蚴检查，它比吉姆萨和瑞氏染色能更好地显示核和鞘膜。虽然这种染液在制备程序上并不困难，但是需要

1周时间，还要再放置1个月后才能使用。Delafield苏木素染液不易购买到商业化试剂且只在特定情况下使用。制备Delafield苏木素染液需将180 g硫酸铝铵溶解于1 L蒸馏水，加热直到溶解，然后冷却（铵明矾）。苏木素晶体（4 g）溶于25 ml 95%的乙醇，然后，将此溶液加入400 ml铵明矾中。用棉塞盖住装溶液的容器，暴露于阳光和空气中1周，然后过滤。在过滤液中，加入丙三醇和95%乙醇各100 ml，然后阳光下放置至少1个月[10]。

基本步骤：玻片上的样本自然干燥。用蒸馏水对血膜溶血15 min，无水甲醇固定5 min，然后自然干燥。染色10～15 min，用水冲洗。自然干燥，加封片液和盖玻片，放大1000倍观察。

2. 铁苏木素染色 铁苏木素染色可用于肠道寄生原虫的检测、鉴定和计数。有许多铁苏木素染色的衍生方法，这些方法均可用于新鲜粪便样本、含PVA的固定样本、保存于绍丁液或SAF样本的永久染色涂片的制备。苏木素-乙醇溶液和硫酸亚铁铵-盐酸溶液等量混合制成铁苏木素染色的工作液，这两种溶液都容易购买。

基本步骤：将制备的玻片放入70%乙醇中5 min。如果使用含汞固定剂，则将玻片放入70%碘乙醇中5 min，然后再放入70%乙醇中5 min（如果使用不含汞的固定剂，不需要后两步）。流水冲洗玻片10 min，然后放入铁苏木素工作溶液中5 min。经过以上染色步骤后，流水冲洗10 min，然后将玻片放入以下试剂各5 min：70%乙醇，95%乙醇、100%乙醇（2次），二甲苯（或替代物）（2次）。加树胶封片剂和盖玻片，放大1000倍观察。

（五）三色染色（Wheatley三色染色）

Wheatley三色染色是一种改良的Gomori组织染色，用于肠道寄生原虫的检测、鉴定及计数[11]。这种染色法使用铬变素2R和亮绿SF染料，直观地辨别肠道寄生原虫包囊和滋养体的内部结构。三色染色常用于含PVA的固定粪便样本或绍丁液保存的样本。MIF或SAF保存的样本及单瓶系统保存的样本，均可进行三色染色。此外，对用这些固定剂或其他固定剂制备的永久染色涂片，一些专有染液也可能会获得更好的染色效果。三色染液在实验室中容易制备，或者也可从供应商处购买。

基本步骤：将制备的玻片放入70%乙醇5 min。对于使用含汞固定剂的标本，需要将玻片放入70%碘乙醇1 min（新鲜标本）或者10 min（PVA固定后自然干燥的标本）。然后再将玻片放入70%乙醇中5 min（两次）。放入三色染色液中10 min，然后用90%乙酸乙醇冲洗1～3 s。将玻片浸入100%乙醇中数次，然后放入100%乙醇3 min（2次），再放入二甲苯5～10 min（2次）。加树胶封片剂和盖玻片。干燥过夜或37℃干燥1 h，放大1000倍观察。如果用95%乙醇代替100%乙醇及使用二甲苯替代物，需要增加乙醇和二甲苯替代物的脱水时间至少5～10 min。

（六）抗酸三色染色

抗酸三色染色技术可用于检测抗酸的球虫（隐孢子虫、贝氏囊等孢子虫和卡耶塔环孢子虫）[12]。用新鲜或保存的粪便标本制备的涂片均可用此法进行染色。

基本步骤：将制备好的自然干燥的玻片放入无水甲醇中5～10 min，让其自然干燥。将玻片放入石炭酸复红溶液中10 min，用流水冲洗。用0.5%的酸性乙醇脱色后流水冲洗。玻片放入37℃的三色染色液中染色30 min。酸性乙醇冲洗10 s，然后将玻片浸入95%乙醇中数次，持续10 s。将玻片放入95%乙醇30 s，然后自然干燥，放大1000倍观察。

（七）其他染色

1. 改良Field染色 改良Field染色有助于棘阿米巴的鉴定。与其他染色法如瑞氏、吉姆萨、姜-尼及三色染色相比，这种染色法有很好的对比度。关于改良Field染液的制备和使用，请参考Pirehma和同事[13]的论文。

2. 改良番红染色 改良番红染色可检出福尔马林固定标本和粪便浓集标本中的环孢子虫卵囊。过去检测这些生物最常用的染色是改良抗酸染色，但是染色特性多变。已报道的环孢子虫卵囊的改良番红染色，染色一致，而且该方法快速、可靠、方便[14]。

基本步骤：将制备的粪便薄涂片放在60℃玻片加热器上直到干燥。用1%番红溶液覆盖涂片，在微波炉中满功率（650 W）加热30～60 s。流水

冲洗涂片 30 s，用 1%亚甲蓝水溶液复染 1 min，流水冲洗，自然干燥。放大 1000 倍观察。

3. 荧光增白剂染色 荧光增白剂是光学增白剂的一种，能与纤维素和几丁质结合，暴露于长波紫外线下时荧光最强。利用这些特性可检测包括耶氏肺孢子菌在内的真菌、自由生活阿米巴，如耐格里属、棘阿米巴属和巴拉姆希属的虫种，以及恶丝虫属幼虫(其角质层含有几丁质)。荧光增白剂可从多家商品供应商处购买，根据生产商的介绍在实验室也易制备。

基本步骤：将标本涂片后自然干燥。玻片用甲醇固定 1～2 min，蒸馏水冲洗，并使其自然干燥。加 1～2 滴 10% KOH，将 1～2 滴荧光增白溶液加至样本上 3 min，用吸收滤光片为 300～412 nm 的荧光显微镜放大 100～400 倍观察。

三、培养基

只有少数几种寄生虫能进行培养，包括棘阿米巴、福勒耐格里阿米巴、疟原虫、肠道阿米巴(如溶组织内阿米巴)、阴道毛滴虫、利什曼原虫和锥虫[7]。但是，大多数的临床诊断微生物实验室并未开展寄生虫培养。只有大型参考实验室或者科研机构可以进行这些寄生虫的培养。阴道毛滴虫是个例外，已有商业化产品供常规实验室使用。表 137-5 列出的许多培养基还没有商业化的产品，但还是列出供参考。关于这些培养基的更多信息请参阅文献[1-2,13,15]。

表 137-5 寄生虫培养使用的培养基

培养基	微生物	评论
棘阿米巴单栖培养	棘阿米巴属和耐格里属	棘阿米巴培养基和覆盖有大肠埃希菌或产气肠杆菌的非营养琼脂 用于脑脊液、组织或土壤样本
Balamuth 蛋黄水浸液培养基	肠道阿米巴	巴拉姆希属不生长 巴拉姆希属仅在培养细胞系中生长
Boeck and Drbohlav 洛克蛋清(LES)培养基	肠道阿米巴	含有血清和米粉的浓缩蛋基斜面
缓冲炭酵母提取物琼脂	棘阿米巴	有些生产商生产的培养基较其他的生长得更好 有些培养基可用于培养滋养体和(或)卵囊
半胱氨酸-蛋白胨-肝-麦芽糖培养基	阴道毛滴虫	加入亚甲蓝染液使生物体可见
成分明确的培养基[16-17]用于病原性耐格里阿米巴	福勒耐格里阿米巴	成分明确的培养基
DGM-21A 培养基	棘阿米巴属	成分明确的培养基
Diamond 胰酶解酪蛋白-酵母提取物-麦芽糖(TYM)完全培养基，Klass 改良的 Diamond 完全培养基	阴道毛滴虫	TYM 不含抗菌药物；一种非选择性培养基 Klass 改良培养基含青霉素 G、链霉素和两性霉素 B 抑制细菌过度生长
Evans 改良 Tobie 培养基	利什曼原虫和克氏锥虫	用牛肉提取物，去纤维蛋白的马血，酚红作为 pH 指示剂
InPouch TV (Biomed Diagnostics, Inc.)	阴道毛滴虫	商业化
Lash 水解酪蛋白血清培养基	阴道毛滴虫	含牛血清，其他阴道毛滴虫培养基不含牛血清
LYI-S-2 培养基	溶组织内阿米巴	与 TYI-S-33 相似
M-11 培养基	卡伯特森氏棘阿米巴	含有 11 种氨基酸的专用培养基
改良哥伦比亚琼脂	阴道毛滴虫	固体琼脂培养基；阴道毛滴虫集群改变 pH 和琼脂平板外观
Nelson 培养基	福勒耐格里阿米巴	含胎牛血清，是福勒耐格里阿米巴生长所必须的
NIH 培养基	利什曼原虫和锥虫	与Evans 改良 Tobie 培养基相似
Novy-MacNeal-Nicolle (NNN)培养基	利什曼原虫和锥虫	氯化钠为基础的琼脂培养基
Offutt 改良的 NNN 培养基	利什曼原虫	基础培养基中加入血，与 NNN 培养基有区别
4 N 培养基	利什曼原虫和锥虫	以糖为基础用 NIH 培养基覆盖

（续　表）

培养基	微生物	评论
含活或死细菌的非营养琼脂	棘阿米巴	有些生产商生产的培养基较其他生长得更好
朊间质蛋白胨-酵母提取物-葡萄糖（PPYG）培养基	棘阿米巴	基础培养基使棘阿米巴生长
蛋白胨-酵母提取物-葡萄糖培养基	棘阿米巴	与 PPYG 培养基相似
SCGYEM 培养基[16]	福勒耐格里阿米巴	非专用培养基
含30%胎牛血清的 Schneider 果蝇培养基	利什曼原虫和锥虫	液体培养基，比血琼脂便宜
毛滴虫培养系统	阴道毛滴虫	商业化
含5%羊血、兔血或马血的胰酶大豆琼脂	棘阿米巴	有些生产商生产的培养基较其他生长得更好
TYI-S-33 培养基	溶组织内阿米巴	不含抗菌药物，一种非选择性培养基
TYSGM-9 培养基	溶组织内阿米巴	含青霉素 G 和链霉素来抑制细菌过度生长
美国陆军医疗研究队	利什曼原虫	特别适用于巴西利什曼原虫复合体的分离
Yeager's LIT（肝提取胰蛋白酶）培养基	克氏锥虫	添加血红素和抗菌药物将克氏锥虫从锥蝽肠道标本中分离
YI-S 培养基	溶组织内阿米巴	与 TYI-S-33 相似

参考文献请扫二维码查阅

第138章 寄生虫检测与鉴定常规方法

LYNNE S. GARCIA, GRAEME P. PALTRIDGE, ROBYN Y. SHIMIZU

（孙恩华 译；曹建平 审校）

本章讨论目前诊断寄生虫感染的常规方法。如果临床样本已按照接收或拒绝接收标准的具体要求进行了妥善收集和处理，则可进行相关检测：包括湿涂片、样品浓集、涂片染色检查、厚血膜、薄血膜和培养基检查，这些均为临床疑似寄生虫疾病的鉴定和确诊提供关键信息[1,6]。核酸扩增和分子检测方法在寄生虫感染诊断中也逐渐被采用。除了少数粪便免疫检测试剂盒外，大多数诊断工作仍依赖于微生物学家的知识和镜检技能。近年来寄生虫学诊断由于很多原因变得尤为重要。世界旅行及病原微生物流行范围的扩大和致病力的变化，均增加了暴露于多种感染因子的潜在风险。了解病原微生物流行的特定地区和所在区域患者人群的构成很重要，尤其是免疫受损患者这类易感人群。医生和微生物学家认识和理解检获虫体与鉴定的诊断方法这一点非常重要。样本收集和处理的详细介绍可见第136章。为了精通医学寄生虫诊断，做大量的检测工作及与此相关的显微镜观察是不可或缺的。

一、粪便样本

粪便标本的收集见第136章，表138-3和表138-6选择了其中一部分列出。粪便样本的处理方法见图138-1至图138-3。下面介绍寄生虫虫卵与虫体（O&P）的常用检验程序，包括生理盐水直接涂片法、浓集法和永久染色涂片法[1-4,6-16]。

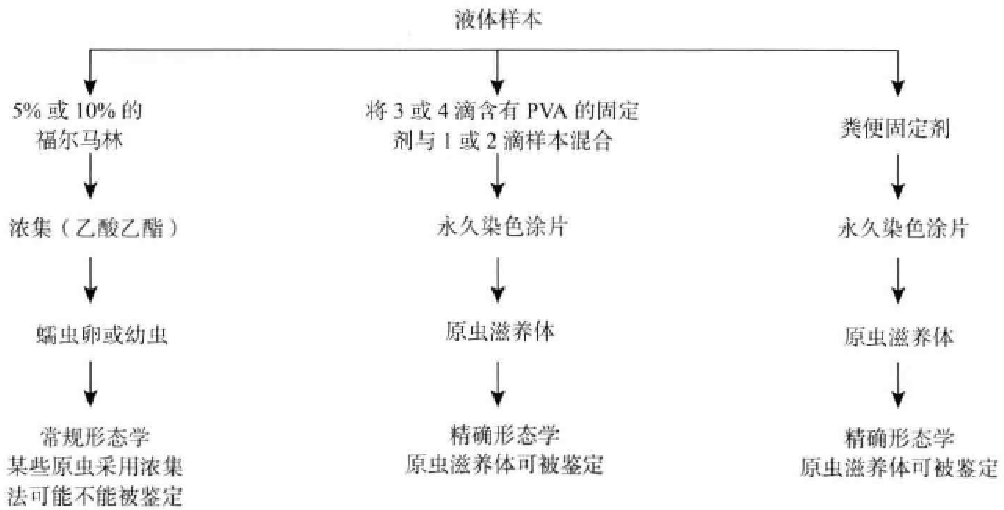


图138-1 液态粪便样本中虫卵和寄生虫的检查[processing for ovum and parasite (O&P) examination]过程。可用聚乙烯醇（PVA）或绍丁固定剂制作永久性染色涂片。可在生理盐水中观察活虫体；碘液会杀死虫体，所以碘液染色的涂片不能用来观察原虫活力。采用乙酸乙酯可能会导致整个样本的去除，样本会进入要被弃去的沉渣层中（液态样本通常包含黏液）；500×*g* 离心10 min（正常离心时间），该过程中不使用乙酸乙酯。一般而言，由于原来绍丁固定液中含有氯化汞，目前实验室多已改用非汞替代品。然而，在某些情况下，术语“绍丁固定液”仍用于描述以前的固定剂，它是制备具有铜或锌基或其他化合物制剂的配方。当固定剂被选择后，重要的是要知道它的配方，以便遵守操作规章来进行实验。转自参考文献[10]

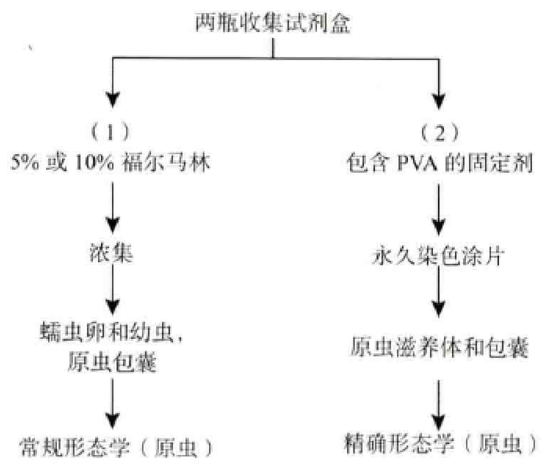


图 138-2　保存粪便样本中虫卵和寄生虫的检查[processing for ovum and parasite (O&P) examination](两瓶收集试剂盒)。依据实验设计，可以采用缓冲液或非缓冲液配制福尔马林。采用氯化汞制备的固定剂可为样本提供最好的生物保鲜。以下情况可以使用替代品，包含锌基的聚乙烯醇、硫酸铜基的聚乙烯醇、醋酸钠及无需黏合剂(聚乙烯醇或白蛋白)的单一固定剂。转自参考文献[10]

(一)直接生理盐水涂片法

直接生理盐水涂片法的目的是确诊原虫或蠕虫的感染，评估患者虫荷和寻找活的虫体(表 138-1)[1,6-7,10-11,14]。对未经冷冻的新鲜粪便样本及在指定时间内送入实验室的样本都可进行检测，但是比起成形的粪便，该方法对于检查水样便或稀软粪便样本时更重要。水样便或稀软粪便更容易包含原虫的滋养体而非包囊，包囊没有活动能力。在判定待检样本为阴性之前，要用低倍镜(放大倍数×100)看完全片(用 22 mm×22 mm 盖玻片)和用高倍镜(放大倍数×400)镜检至少 1/3 玻片标本。通常生理盐水直接涂片检查结果被认为是推断性的，但是某些虫种[十二指肠贾第鞭毛虫(*Giardia duodenalis*)、蓝氏贾第鞭毛虫(*G. lamblia*)和肠贾第鞭毛虫(*G. intestinalis*)的包囊和滋养体，结肠内阿米巴(*Entamoeba coli*)的包囊，布氏嗜碘阿米巴(*Iodameba bütschlii*)的包囊，蠕虫卵和幼虫，贝氏等孢球虫(*Cystoisospora belli*)卵囊]可直接鉴定。这种方法获得的结果被视为是初步的，随着浓集和永久性染色涂片结果的判读将获得最终报告。值得注意的是由于样本处理过程中的各种溶液导致生物体活力丧失，因此，直接生理盐水涂片和浓集法不相关。尽管要求水样便或者非常柔软的新鲜粪便在采样 30 min 内处理，但这通常是不切实际的，因此采集的粪便通常需要经过防腐处理。

如果增强对比度的制剂中加入碘，会杀死寄生虫进而观察不到其运动能力。送检的含有防腐剂的粪便样本无需直接涂片检查，可直接进行浓集和永久性涂片检查。使用含碘试剂时对湿片检查是不做要求的，当然这由使用该类显微镜的实验室自己决定。

(二)浓集法 (concentration wet mount)

浓集法的目的是从粪便碎片中分离寄生虫和通过沉淀或漂浮法浓集寄生虫[1,6-8,10-11,14]。浓集法是最常用的方法，该方法的沉积物中能够检测到所有的生物体。漂浮法是有局限性的，因为并非所有的寄生虫都会漂浮，离心速度和离心时间是成功的关键。浓集法特别用于收集原虫包囊、球虫卵囊和微孢子虫芽孢(目前归为真菌)、蠕虫卵和幼虫(表 138-2)。任何新鲜的或保存的粪便样本都可检查。浓集法收集样本进行涂片检查与直接生理盐水涂片法相同(图 138-4)。碘液加入过多则可能导致蠕虫卵的观察模糊(虫卵可能比较像碎屑)，碘液需针对被检测的个例来使用。通常浓集法检测的结果是初步的，但是对某些虫种的包囊，如十二指肠贾第鞭毛虫、蓝氏贾第鞭毛虫、肠贾第鞭毛虫、结肠内阿米巴的包囊，布氏嗜碘阿米巴的包囊、蠕虫卵和幼虫，贝氏等孢球虫的卵囊浓集法检测结果可作为确诊依据。浓集法后进行的涂片检测结果被认为是初步的，最终的检测报告是依据永久性染色涂片的结果来判定的。

福尔马林-乙酸乙酯沉淀法是最常用的浓集方法，其离心速度和时间分别为 $500 \times g$ 和 10 min。在该方法中采用乙酸乙酯代替乙醚。然而，值得注意的是，乙酸乙酯不能用于水样便或含有大量黏液样本的浓集。乙酸乙酯可将液体或黏液标本的内容物拉入碎屑层，碎屑层将被丢弃。虽然从液体或黏液标本中回收寄生虫可能不成功，但仍推荐这种简单的离心方法。标准硫酸锌漂浮法不能用于检测有卵盖或较重的虫卵，应用此法时，在判定结果为阴性前，要对表层液体和沉淀进行检查。

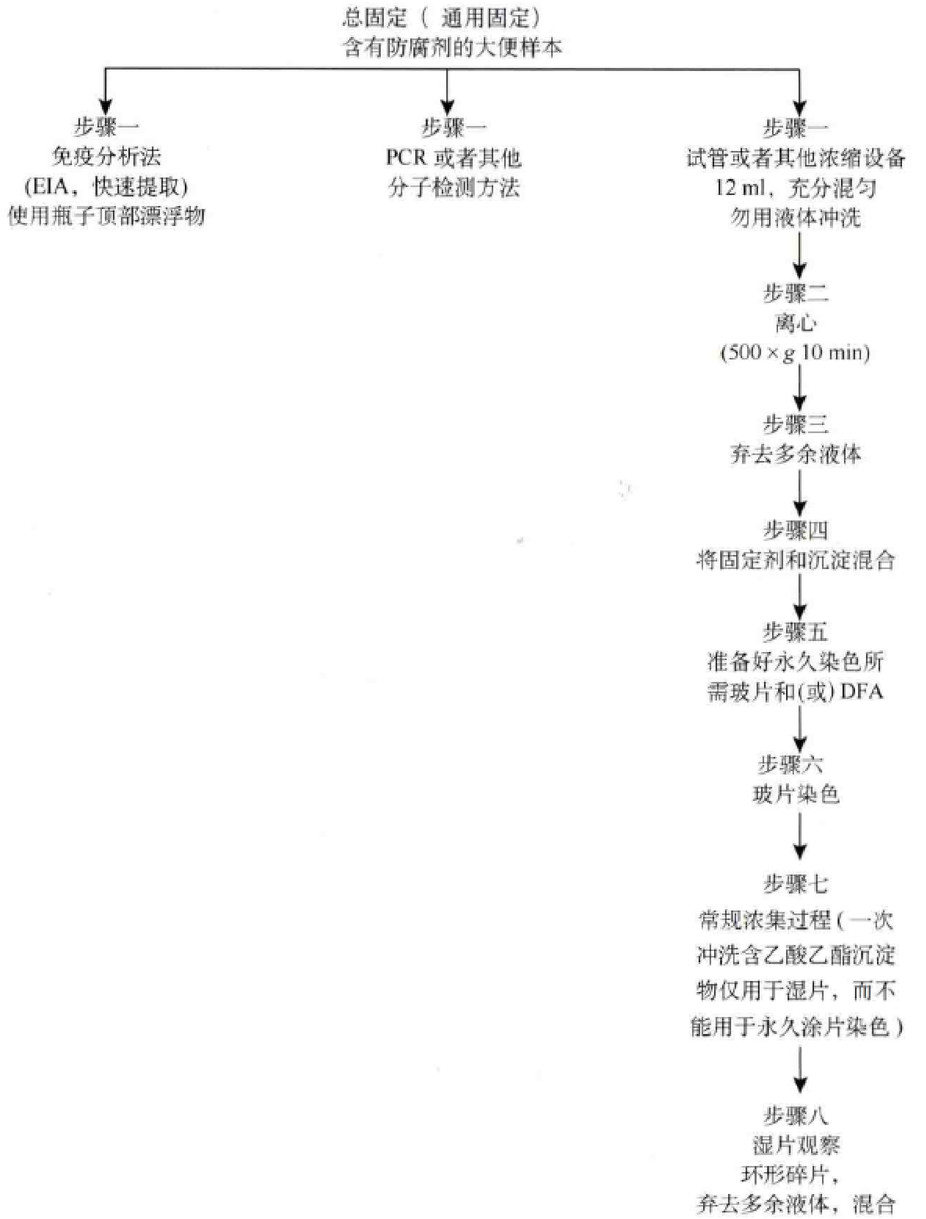


图 138-3 保存的粪便进行 O&P 检查的处理流程（单瓶收集试剂盒）。有单瓶收集系统，其中的配方是专有的；许多试剂的关键组分之一是硫酸锌。除了 SAF，这些固定剂与免疫分析试剂并不总是相容，特别是如果固定剂含有 PVA。其他选择包括 TOTAL-FIX（不含汞、福尔马林或聚乙烯醇的单瓶固定剂）（医药化学公司）和 Ecofix（俄亥俄州辛辛那提市 Meridian Biosciences）。此图提供了 3 个分析步骤。在某些情况下，使用前需要执行内部验证程序。商业验证程序正在进行中，并应在不久的将来可用于其中一些产品。使用试剂盒时务必仔细阅读包装手册，了解是否需要额外的验证程序

表 138-1 湿涂片中寄生虫的诊断特征

样本	特征观察	
	原虫	蠕虫
粪便，其他来自消化道和泌尿系统的样本	大小、形状、发育时期（滋养体、包囊前期、包囊和卵囊）、活性（仅用于新鲜粪便）、趋光性、细胞质（棒状拟染色体、糖原、空泡、轴丝、伪足、中体、子孢子）	虫卵、幼虫或成虫；大小；内部结构 虫卵：内含胚胎、卵盖、肩、无卵盖增厚或辐射状的卵壳、小钩、轴丝、棘 幼虫：头部和尾部的形态，消化道 成虫：线虫、吸虫和绦虫

表 138-2 蠕虫卵[a] 的鉴定

描述	鉴定
1. 小虫卵(25～40 μm)	
A. 有卵盖、通常为卵圆形、有肩峰(虫卵<35 μm);支睾属有卵盖和肩峰,被胆汁染色,可能有一个小疣,内部有毛蚴,但较难看到	支睾(后睾)属(中华肝吸虫)[*Clonorchis*(*Opisthorchis*) spp.]或肠道吸虫[异形吸虫(*Heterophyes*)或横川后殖吸虫(*Metagonimus yokogawai*)]
B. 厚的条纹辐射状的卵壳(个别虫卵内可见六钩蚴,如带绦虫属(*Taenia* spp.);虫卵通过含有 6～10 个虫卵的卵袋产出;每个虫卵大小为 25～40 μm)	犬复孔绦虫(*Dipylidium caninum*)(犬和猫体内的绦虫);卵袋>150 μm
C. 厚的放射状条纹的卵壳(六钩蚴在福尔马林固定的粪便样本中可能看不到)(如果对虫卵不进行特殊的染色则不能被鉴定到种的水平)(虫卵大小为 30～47 μm)	带绦虫属(*Taenia* spp.)[牛带绦虫(*T. saginata*),也被称为牛肉绦虫;猪带绦虫(*T. solium*),也被称为猪肉绦虫]
D. 卵壳薄,在卵壳和胚胎之间有一层透明带,球形或橄榄形,内含六钩蚴;在卵壳和胚胎之间可见轴丝(虫卵大小为 31～43 μm)	短膜壳绦虫(*Hymenolepisnana*)(微小膜壳绦虫)
2. 中等大小的虫卵(40～100 μm)	
A. 虫卵呈桶形,有明显的卵塞(虫卵长 50～54 μm,宽 20～23 μm)	毛首线虫(*Trichuristrichiura*)(鞭虫)
B. 虫卵一端扁平,可能包含幼虫(虫卵长 70～85 μm,宽 60～80 μm)	蠕形住肠线虫(*Enterobius vermicularis*)(蛲虫)
C. 虫卵有厚的、结节状(不平的)外膜(除去外壳的虫卵外膜常常缺失)(虫卵长 45～75 μm,宽 35～50 μm)	似蚓蛔线虫(*Ascaris lumbricoides*)(大蛔虫)受精卵
D. 虫卵的两端呈圆形,卵壳薄(包含 8～16 个胚细胞的发育中的胚胎)(虫卵长 56～75 μm,宽 36～40 μm)	钩虫(*Hookworm*)
E. 有卵盖,有时卵盖破碎而不易见,从卵壳到卵盖的过渡光滑;卵盖对侧一端的虫卵可有一"突起"(虫卵长 58～75 μm,宽 40～50 μm)	裂头属绦虫(*Diphyllobothrium* spp.)(广泛的鱼类绦虫)
F. 在卵壳和胚胎之间有一层透明带,球形或橄榄形,内含六钩蚴;在卵壳和胚胎之间无轴丝(虫卵长 70～85 μm,宽 60～80 μm)	缩小膜壳绦虫(*Hymenolepisdiminuta*)(感染鼠的绦虫)
3. 大虫卵(100～180 μm)	
A. 虫卵有卵盖和肩峰,卵盖对侧一端的卵壳变厚,但并不总是可见(虫卵长 80～120 μm,宽 48～60 μm)。虫卵被描述为"urn-型"	并殖吸虫(*Paragonimus* spp.)(肺吸虫)
B. 虫卵两端内陷;卵壳长且薄,内含胚胎(虫卵长 73～95 μm,宽 40～50 μm)	毛圆线虫属(*Trichostrongylus* spp.)
C. 虫卵有厚的、结节状(不平的)外膜(除去外壳的虫卵外膜常常缺失)(虫卵长 85～95 μm,宽 43～47 μm)	似蚓蛔线虫(*Ascaris lumbricoides*)(大蛔虫);未受精
D. 虫卵中包含有长皮棘和纤毛的毛蚴,外侧的皮棘很短(虫卵长 70～100 μm,宽 55～65 μm)	日本血吸虫(*Schistosoma japonicum*)(血液吸虫,粪便)
E. 虫卵中包含有长皮棘和纤毛的毛蚴,皮棘位于毛蚴末端(虫卵长 112～170 μm,宽 40～70 μm)	湄公血吸虫(*S. mekongi*)(比日本血吸虫的虫卵要圆一些,小一些);虫卵长 50～65 μm,宽 30～55 μm
F. 虫卵中包含有长皮棘和纤毛的毛蚴,皮棘位于毛蚴末端(虫卵长 140～240 μm,宽 50～85 μm)	埃及血吸虫(*S. haematobium*)(血液吸虫,尿)
G. 虫卵中包含有长皮棘和纤毛的毛蚴,大的外侧皮棘(虫卵长 114～180 μm,宽 45～70 μm)	间插血吸虫(*Schistosoma intercalatum*)(血液吸虫,粪便) 曼氏血吸虫(*S. mansoni*)(血液吸虫,粪便)
H. 虫卵>85 μm,有时卵盖破碎而不易见,从卵壳到卵盖 逐渐光滑。虫卵排出时处于未发育阶段(虫卵长 130～140 μm,宽 80～85 μm)	布氏姜片吸虫(*Fasciolopsis buski*)(大型肠道吸虫)或肝片吸虫(*Fasciola hepatica*)(绵羊肝吸虫)或棘口类吸虫(*Echinostoma* spp)

注:[a] 本表虽然没有包括现有人体寄生虫中所有可能的蠕虫,但是基本上涵盖了可能的蠕虫感染

(三)永久染色涂片

1. 三色染色、铁苏木素染色、铁苏木素/石炭酸品红染色 永久染色涂片为背景碎屑和寄生虫的分辨提供对比色(图 138-4,表 138-3 至表 138-5)[1,6-7,10-11,14]。永久染色粪便样本涂片在油镜下可用来检查和鉴定寄生虫的形态(放大倍数×1000)。该方法主要用在除球虫(使用三色-苏木

素/苯酚品红方法)和微孢子虫(*microsporidia*)外较常见的肠道原虫滋养体和包囊的检查和鉴定中。建议至少观察300个油镜视野,如在浓集过程中怀疑样本中包含寄生虫则需要采用其他检测方法。不建议在特定的感染时间内使用玻片镜检,因为每位镜检操作人员看片的速度是不同的。尽管浏览300个视野是很耗时的过程,但比看完全片要花费较少的时间,这就需要有经验的镜检人员来进行操作。根据实验人员的专业知识、患者人群和阳性标本的比例,不同实验室可采用不同的方法来制作永久染色涂片进行检查。有些实验室用60×油浸物镜进行样本筛选(放大倍数×600);但是,在出具样本检测报告为阴性前(未检出寄生虫),必须在总放大倍数为×1000时进行足够多的视野的检查。

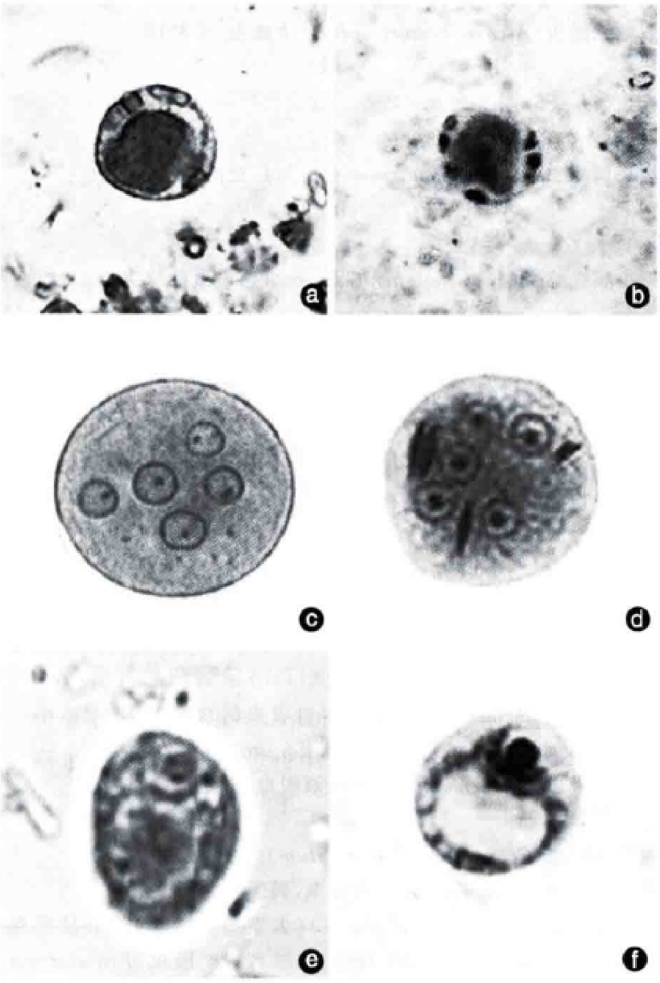


图138-4 碘染湿片(a,c,e)和永久性惠特利三色染色片(b,d,f)图例

注:a,b. 芽囊原虫属,中央体形成;c,d. 大肠埃希菌孢囊;e,f. *I. bütschlii* 孢囊。值得注意的是,在芽囊原虫属和 *I. bütschllii* 涂片制备中,中心体区和大的糖原空泡明显被碘染色,见彩插

2. 改良抗酸染色(modified acid-fast staining) 改良抗酸染色法用于提供背景和寄生虫样本的对比色,并允许检查和识别在高倍非油镜下生物体的抗酸特性(放大倍数×400)[1,6-7,10-11,14]。该方法可用来进行隐孢子虫、卡耶塔环孢子虫和贝氏等孢球虫的检测(图138-5)。卡耶塔环孢子虫抗酸染色变化比隐孢子虫大。然而,偶尔隐孢子虫的抗酸染色有差异,尤其是在脱色剂太强的情况下[17]。1%的酸脱色可为所有顶复亚门检测提供良好的结果。虽然某些微孢子虫的孢子也是抗酸阳性,但是它们的小尺寸使得鉴别很困难;改良三色染色可用来检测微孢子虫的孢子。镜检需要进行最少300个视野的油镜检测。球虫卵囊的染色常使用改良萋-尼染色和Kinyoun抗酸染色法。该方法的局限性通常涉及样本处理,包括适当的采集、离心速度和时间,以及用于脱色步骤中酸的百分比。另一个很好的选择是改良的safranine法[1]。

3. 改良三色染色法(modified trichrome stains) 改良三色染色法主要用于离心的粪便样本中微孢子虫孢子的回收和鉴定;油镜下可见孢子的内部形态[具有水平和斜纹的微管(放大倍数×1000)](图138-6)。任何新鲜的或在SAF中

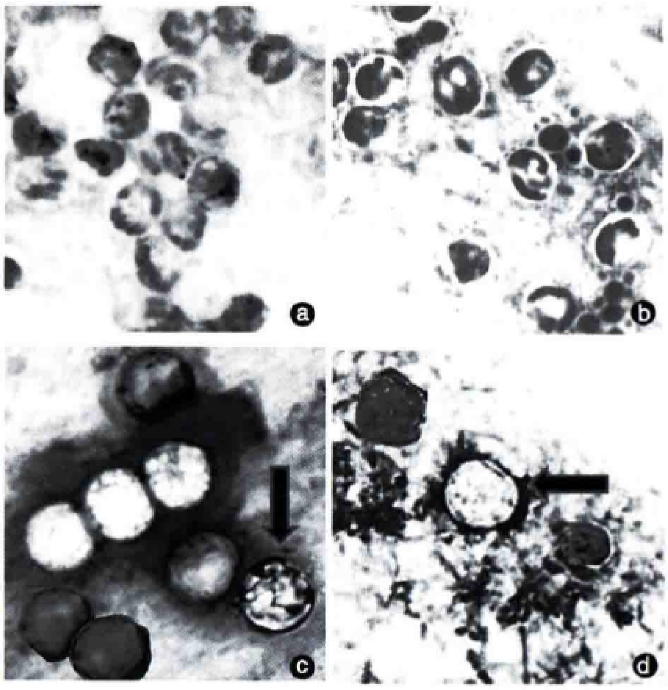


图138-5 改良抗酸染色

注:a,b. 隐孢子虫卵囊,4~6 μm(注意,弯曲的子孢子可以在一些卵囊中看到,这些卵囊通过后立即具有传染性);c,d. 环孢子虫卵囊,8~10 μm,这些卵囊通过后不会立即感染。注意,一些环孢菌卵囊不染色(改良的抗酸染色多变);另外,一些卵囊看起来像皱褶的箭头,见彩插

表 138-3　永久染色涂片(permanent stained smears)中寄生虫的诊断特征

样本	特征观察	
	原虫	蠕虫
粪便,其他来自肠道和泌尿生殖系统的样本	大小、形状、发育时期(滋养体、前包囊、包囊、卵囊和孢子) 细胞核的排列,胞浆内容物(棒状拟染色体、空泡、轴线、轴杆、中体、子孢子、极管) 结肠小袋纤毛虫的滋养体和包囊可能会由于过度染色而看不到	虫卵、幼虫和(或)成虫可能会由于过度染色或变形而不能被鉴定或失真

表 138-4　肠道阿米巴鉴定(identification of intestinal amebae)的要点(永久染色涂片)

1. 滋养体	2
包囊	7
2. 滋养体>12 μm	3
滋养体<12 μm	4
3. 核仁位于中心且紧实;外周的核染色质排列均匀;胞浆"清澈"	溶组织阿米巴(*E. histolytica* a)[a]
核仁位置偏且分散;外周染色质排列不齐;胞浆"浑浊"	结肠内阿米巴(*E. coli*)
4. 外周的核染色质	5
除上述以外	6
5. 核仁位于中心且紧实(核看起来像一个靶标);外周的核染色质排列均匀;胞浆"清澈"	哈氏内阿米巴(*E. hartmanni*)
核仁大,点状;广泛的核变异(核变异可能包括周边染色质)	微小内蜒阿米巴(*E. nana*)
6. 无外周染色质,核仁大,浑浊的胞浆	布氏嗜碘阿米巴(*Iodamebabütschlii*)
无外周染色质,核仁易变,胞浆清澈	微小内蜒阿米巴(*Endolimaxnana*)
7. 包囊>10 μm(包括任何缩小的"光晕")	8
包囊<10 μm(包括任何缩小的"光晕")	10
8. 单阿米巴样核(内部有大的包涵体)	波列内基阿米巴(*E. polecki* b)[b]
多核	9
9. 4 个阿米巴样核,棒状染色体有光滑的圆形末端	溶组织内阿米巴(*E. histolytica* a)[a]
5 个或更多的阿米巴样核,棒状染色体有尖锐的末端(棒状拟染色体通常不出现)	结肠内阿米巴(*E. coli*)
10. 单核(可能呈现"篮子"样的核),大的糖原液泡	布氏嗜碘阿米巴(*Iodameba bütschlii* c)[c]
多核	11
11. 4 个阿米巴样核,棒状染色体有光滑的圆形末端(核可能也只有 2 个)	哈氏内阿米巴(*E. hartmanni*)
4 个核仁,无周边染色质,圆形到卵圆形	微小内蜒阿米巴(*Endolimaxnana*)[d]

注:[a]溶组织阿米巴(*E. histolytica* a)包括溶组织阿米巴/迪斯帕内阿米巴群或者复合种。溶组织阿米巴(致病性)可通过在滋养体胞浆中发现红细胞来确定。否则,根据溶组织阿米巴(致病性)和迪斯帕内阿米巴(非致病性)的形态学不能将两者区分。应报告:溶组织阿米巴/迪斯帕内阿米巴(或复合种)[*E. histolytica*/*E. dispar* group(or complex)]。[b] 区分波列内基阿米巴(*Entamoebapolecki*)滋养体和溶组织阿米巴/迪斯帕内阿米巴群(*the E. histolytica*/*E. dispargroup*)、结肠内阿米巴(*E. coli*)或莫氏内阿米巴(*E moshkovskii*)是困难的。[c]尽管某些布氏嗜碘阿米巴(*I. bütschlii*)的包囊大于 10 μm,大部分其包囊的大小在 9~10 μm,可通过典型的糖原液泡来进行适当的鉴别。[d] 微小内蜒阿米巴(*E. nana*) 和脆弱双核阿米巴(*Dientamoeba fragilis*) (flagelleta, 表 138-5) 非常类似,特别是在滋养体状态下。由于 *Dientamoeba fragilis* 属于鞭毛虫,其鉴定要点见表 138-5

表 138-5 肠道鞭毛虫鉴定(identification of intestinal flagellates)的关键点

1. 滋养体	2
包囊[a]	7
2. 梨形	3
其他形态	6
3. 2 个核,有吸盘	十二指肠贾第鞭毛虫(蓝氏贾第鞭毛虫,肠贾第鞭毛虫)
单核	4
4. 肋体长	人五毛滴虫(*Pentatrichomona shominis*)
无肋	5
5. 胞口,>10 μm	迈氏唇鞭毛虫(*Chilomastixmesnili*)
胞口,<10 μm	肠内滴虫或人肠滴虫(*Retortamonas intestinalis* 或 *Enteromonas hominis*)
6. 阿米巴形,1 或 2 个分段的核	脆弱双核阿米巴(*Dientamoeba fragilis*)
卵圆形,1 个核	人肠滴虫
7. 卵圆形或圆形包囊	8
柠檬形包囊	9
8. 4 个核,中体,轴丝,>10 μm	十二指肠贾第鞭毛虫(蓝氏贾第鞭毛虫,肠贾第鞭毛虫)
2 个核,无纤维,<10 μm	人肠滴虫(*E. hominis*)
9. 1 个核,shepherd 钩纤维	迈氏唇鞭毛虫(*C. mesnili*)
1 个核,鸟喙样纤维	肠内滴虫

注:[a]尽管脆弱双核阿米巴已经被确认为生命周期的一个阶段,但是任何一个粪便涂片中囊肿的数量非常低(约为 1%),因此其不在这个分类要点中,但是根据鞭毛虫的分类,它被列在了这个表中

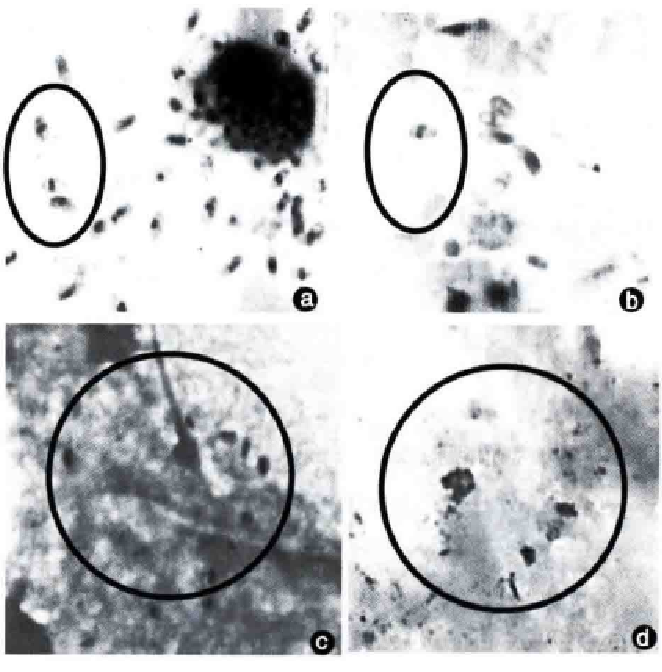


图 138-6 改良三色染色法(modified trichrome stains)

注:a,b. 小孢子虫孢子,1.5~2.5 μm;注意孢子内的水平线或对角线(椭圆形),极性小管的证据。左侧涂片显示韦伯蓝复染,右侧涂片显示韦伯绿复染。c,d. 眼睛标本上的小孢子虫孢子。c. 革兰染色(注意与细菌的相似性)。d. 角膜刮伤被革兰染色(再次注意,与细菌相似)。错误的鉴定可能导致不适当的治疗和严重的后遗症,见彩插

保存,以及单瓶固定系统中的粪便样本均可用来检查。聚乙烯醇(PVA)固定的样本至少需要进行 300 个视野的油镜检查。微孢子虫孢子的鉴定则可用上述方法,但它们的大小使得鉴别很困难,尤其是在临床样本中虫体较少的情况下。虫种分类的鉴定需依靠电镜或分子方法,如 PCR(第 131 章)。

(四)免疫学方法

商业化的免疫试剂可用于某些原虫的检测,例如,十二指肠贾第鞭毛虫(蓝氏贾第鞭毛虫和肠贾第鞭毛虫)、隐孢子虫、组织内阿米巴-迪斯帕内阿米巴(the *Entamoeba histolytica-Entamoeba dispargroup*)和溶组织内阿米巴(*Entamoeba histolytica*)(表 138-6)。这些方法[酶免疫测定法(EIA)、荧光抗体法(FA)、免疫层析法(微量)]可用来选择检测相应寄生虫的抗原;阴性结果不排除这些寄生虫/抗原量少或其他肠道寄生虫引起的疾病的可能性,包括双核阿米巴(*Dientamoeba fragilis*)、微孢子虫(*microsporidia*)和蠕虫[1,18-20](图 138-7)。目前,针对双核阿米巴和酵母菌属(*Blastocystis* spp.)正在进行免疫试剂的研发和试用。微孢子虫的检测可采用粪便免疫检测法,

表 138-6　肠道寄生虫的商业化免疫检测试剂盒[a]

新鲜粪便样本		保存在 5%～10%的福尔马林、醋酸钠或其他单瓶系统	
未浓集	浓集	未浓集	浓集
酶联免疫(EIA)	DFA[c]	EIA	DFA
隐孢子虫属	隐孢子虫属	隐孢子虫属	隐孢子虫属
蓝氏贾第鞭毛虫[b]	蓝氏贾第鞭毛虫[b]	蓝氏贾第鞭毛虫[b]	蓝氏贾第鞭毛虫[b]
溶组织阿米巴		免疫层析(滤芯式)	
溶组织阿米巴/迪斯帕内阿米巴		隐孢子虫属	
免疫层析(滤芯式)		蓝氏贾第鞭毛虫属[b]	
隐孢子虫属			
蓝氏贾第鞭毛虫属[b]			
溶组织阿米巴/迪斯帕内阿米巴			
溶组织阿米巴			

注：[a] 当然还有其他贴有有效 CE 标志的产品，有效的 CE 标志表明其符合相关的欧洲新方法和产品的安全指令。这些指令包含产品在欧盟销售必须满足的基本要求。[b] 诊断试剂盒保留了蓝氏贾第鞭毛虫的名称。[c] DFA，直接荧光抗体法

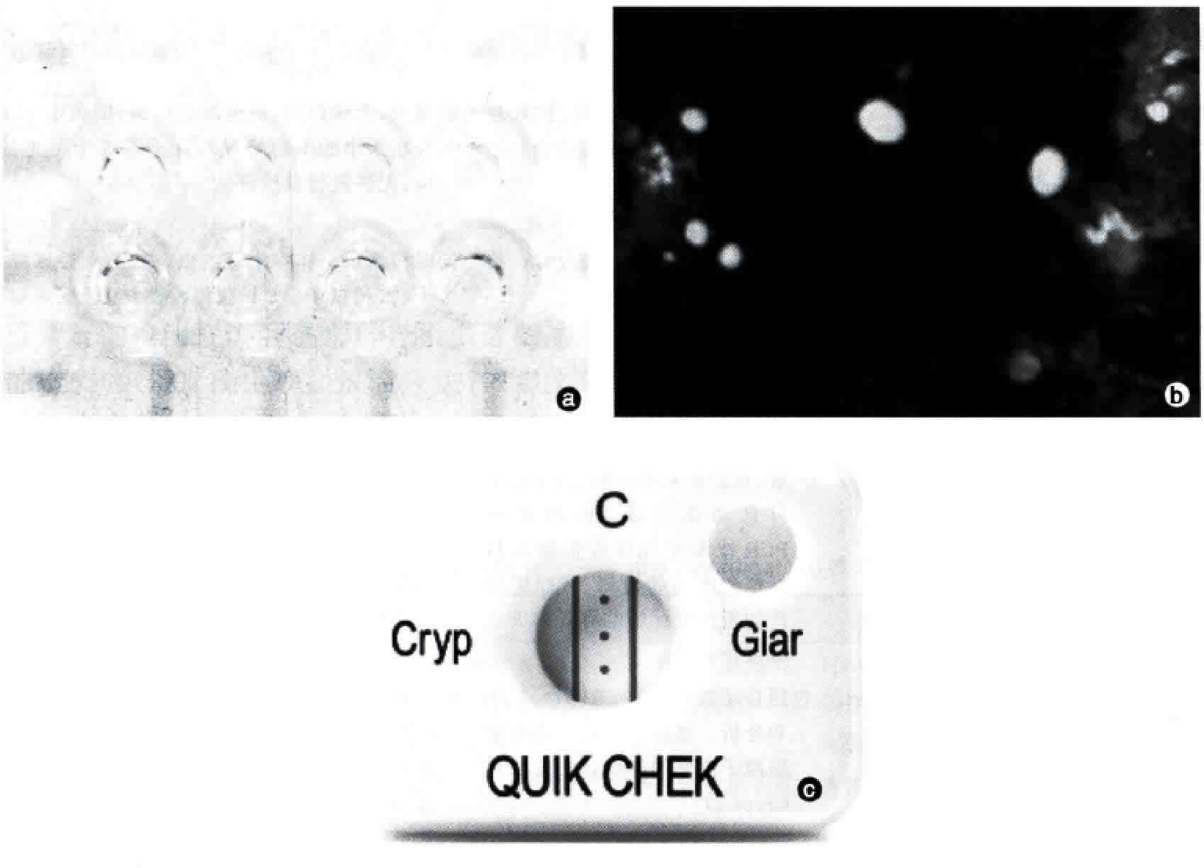


图 138-7　粪便样本免疫分析示例

注：a. 酶免疫分析板条示例；这些通常是 96 孔托盘或单个杯排，可以插入支架（由 TECHLAB，Inc.，Blacksburg，VA 和 Alere North America，Orlando，FL 提供）。b. 贾第虫-隐孢子虫荧光分析组合示例（大的生物体为贾第虫囊，小的生物体为隐孢子虫卵囊）（由加利福尼亚州托伦斯市医药化学公司提供）。c. 贾第虫和（或）隐孢子虫的快速检测卡示例（由 TECHLAB，Inc.，Blacksburg，VA 和 Alere North America，Orlando，FL 提供）。注意，在这个检测卡中，隐孢子虫和贾第虫的线都是阳性的，点控制线也是阳性的，见彩插

目前，该方法尚未被美国 FDA 批准在美国境内使用。当然还有其他贴有有效 CE 标志的产品，有效的 CE 标志表明其符合相关的欧洲新方法和产品的安全指令。这些指令包含产品在欧盟销售必须满足的基本要求。

(五)分子方法

2013 年 1 月，美国 FDA 批准了首个分子检测法可用来同时检查来自同一患者中引起感染性胃肠炎的 11 种常见病毒、细菌和寄生虫(隐孢子虫和贾第鞭毛虫)(xTAG 肠道病原盘；Luminex, Inc., Austin, TX)。现在还有很多分子系统可供选择(表 138-7)[21]。

有针对肠道寄生虫的分子检测正在进行临床试验。这些实验采用分子胃肠道病原盘试剂盒，并以最常见的细菌、病毒、粪便中的寄生虫为检测目标。尽管实验室开发了能用于大多数寄生虫检测的试剂，但是这些检测试剂不是商业化的或只能在特定的检测中心里应用。当采用上述检测试剂进行试验时，应该考虑采用扩增内标(internal amplification controls)来应对检测抑制，因为常见的标本，如血液和粪便，都含有 PCR 抑制剂，这些在临床检测之前都需要经过充分的验证。

表 138-7 FDA 批准的可用于寄生虫感染检测的分子诊断方法[a]

检测试剂(生产商)	描述	评价
APTIMA (Gen-Probe, San Diego, CA) 阴道毛滴虫(*Trichomonasvaginalis*)	借助于靶捕获、转录介导扩增和杂交保护分析等技术的核酸检测方法	高敏感性和高特异性；对寄生虫的活性和动力无要求，由于治疗后核酸还会存在，因此，无法进行预后评估，获得的是定性结果
Affirm VPIII 微生物鉴定试剂 (Becton DickinsonCo., Franklin Lakes, NJ) 阴道毛滴虫(*Trichomonasvaginalis*)	使用 2 个单链核酸探针，捕获探针和显色探针的检测方法	阴道炎：念珠菌属，阴道加德纳菌，阴道毛滴虫。探针分析卡中的生物特异性珠上有 5 个可见的蓝色反应；无法进行预后评估
BD MAX CT/GC/TV 阴道检测板(Becton Dickinson Co., Franklin Lakes, NJ) 沙眼衣原体(*C. trachomatis*) 阴道毛滴虫(*T. vaginalis*) 淋病奈瑟菌(*N. gonorrhoeae*)	基于 *TaqMan* 的多重 *PCR* 技术；中度复杂允许	同时检测单一样本中寄生虫；男性/女性尿样、阴道拭子、宫颈拭子。3 h 获得检测结果，试剂室温保存；无法进行预后评估
BD MAX 肠道寄生虫检测板 (Becton Dickinson Co., Sparks, MD) 蓝氏贾第鞭毛虫(*Giardia lamblia*) 隐孢子虫(*C. hominis*, *C. parvum*) 痢疾阿米巴(*Entamoebahistolytica*)	多重定性体外诊断试剂。样品裂解、核酸提取和浓缩、试剂脱水可自动化完成。使用实时 PCR 技术完成核酸扩增和目标核酸序列的检测，目标扩增产物用荧光标记的自我淬灭水解探针检测	同时鉴别检测蓝氏贾第鞭毛虫、隐孢子虫(痢疾阿米巴的 DNA。与所有基于 PCR 的体外诊断试验一样，可检测到低于分析敏感性的极低水平靶点，但结果可能不可重复。如果寄生虫核酸水平低于检测阈值，也可能出现假阴性。定性检验；不用于监测治疗
BioFire Film Array 胃肠检测板条(bioMérieux, Marcy l'Étoile, France) 隐孢子虫属(*Cryptosporidium*spp.) 环孢子虫属(*Cyclosporacayetanensis*) 痢疾阿米巴(*Entamoebahistolytica*) 蓝氏贾第鞭毛虫(*Giardia lamblia*)	包括自动核酸提取、逆转录、扩增和分析。该板条包括 2 种检测隐孢子虫属的方法(Crypt 1 和 Crypt 2)	单一样本 1 h 后可获得结果。每个膜阵列袋包含一个内部核酸提取质控和一个 PCR 质控。痢疾阿米巴在较高水平时可能与非致病的 *E. dispar* 发生交叉反应。可检测大约 23 种不同的隐孢子虫，包括最常见的人类临床相关物种(如 *C. hominis* 和 *C. parvum*)及一些不太常见的物种(如 *C. meleagridis*、*C. felis*、*C. canis*、*C. cuniculus*、*C. muris* 和 *C. suis*)。巢式 PCR 和融化曲线
LuminexxTAG 胃肠病原体检测板条(Luminex, Inc., Austin, TX) 隐孢子虫属 *Cryptosporidium* spp. (*C. hominis*, *C. parvum* only) 痢疾阿米巴(*Entamoebahistolytica*) 蓝氏贾第鞭毛虫(*Giardia lamblia*)	借助于多重核酸检测技术可同时定性检测和鉴定人体粪便样本中多种病毒、寄生虫和细菌核酸	对待检测标本活力无要求。尚不确定能否用于治疗效果监测。PCR 及 xTAG(荧光微珠检测)

（续　表）

检测试剂(生产商)	描述	评价
NanosphereVerigene肠道病原体检测板条(recently acquired by Luminex)；VerigeneEP Flex[Nanosphere(now Luminex)，Northbrook，IL]（estimated release，2018）*Blastocystis* spp 酵母菌属(Blastocytis spp.) 隐孢子虫属(*Cryptosporidium* spp). 环孢子虫属(*Cyclosporacayetanensis*) 脆弱双核阿米巴(*Dientamoebafragilis*) 痢疾阿米巴(*Entamoebahistolytica*) 蓝氏贾第鞭毛虫(*Giardia lamblia*) 微孢子虫(Microsporidia) 粪类圆线虫(*Strongyloidesstercoralis*)	PCR＋金纳米粒子杂交；定性，杂交分析基础之上	全自动封闭系统；多个报告配置；取消医生测试选择的前分解步骤；提高病原体检测的敏感性
SMART Leish PCR技术(Walter Reed Army Institute of Research，U.S. Army Medical Materiel Development Activity，Cepheid USA，Inc.，Cepheid，Sunnyvale，CA)	实时定性PCR用于扩增引起皮肤利什曼病的寄生虫特有的DNA序列	当显微镜和培养结果在第30天呈阴性时，其可提供一致的结果

注：[a] 还有其他的有效的CE标志的产品；产品上粘贴的有效CE标志表明其符合相关的欧洲新方法产品安全指令。这些指令包含产品在欧盟销售必须满足的基本要求

二、粪便检测的其他技术

尽管常规的检测方法可用来进行大多数肠道寄生虫的检测(包括直接生理盐水涂片法、浓集法和永久染色涂片法)，但收集和鉴定某些特殊寄生虫的其他检测技术也会用到[1,6-7,10-11,14]。大多数实验室通常不能完全提供上述技术，但大部分检测操作都是相对容易并且价格合理。在某些情况下，检查粪便中绦虫的头节和节片，线虫的成虫及吸虫，以明确诊断和(或)种的鉴定很有必要(表138-8)。该阶段的虫体收集方法在本章中也有描述。

表138-8　其他蠕虫回收和鉴定(helminth recovery and identification)技术(O&P检测以外的技术)

种类	样本	方法
线虫	新鲜粪便样本，未经冷冻(所有的虫种均	Harada-Mori滤纸条滤纸/斜面培养
粪类圆线虫	可通过右侧列出的方法进行回收)	活性炭培养贝尔曼试验
钩虫	新鲜的粪便，冷冻的样本	琼脂平板培养(主要用于粪类圆线虫)
毛圆线虫属	透明胶带，搅棒，肛拭子和其他收集装置	直接涂片(Beaver)[a]
钩虫		稀释虫卵计数(Stoll)[a]
似蚓蛔线虫(*Ascaris lumbricoides*)		可根据以上两种方法估计虫荷数[a]
人鞭虫(*Trichuris trichiura*)		直接显微镜镜检
蛲形住肠线虫(*Enterobius vermicularis*)		
吸虫	新鲜的粪便样本，未经冷冻	
血吸虫属(*Schistosoma* spp.)	新鲜的尿(24 h，个体单独收集)	虫卵孵化试验
绦虫	节片(孕节)	虫卵活力试验
带绦虫	保存在5%～10%的福尔马林中的粪	墨汁注射
	便样本	寻找节片

注：[a]尽管这2种方法曾经都被使用过，目前，世界卫生组织建议采用加藤厚粪涂片法和McMaster虫卵计数法，这2种方法可以用于大型寄生虫病消除方案中。在大多数诊断实验室中，以上方法均为常用方法；通常它们的使用仅限于相关地理区域和(或)研究中[27]

(一)线虫幼虫期的培养

土壤或组织中孵化的幼虫引起的线虫感染可以通过粪便培养法和浓集幼虫法进行诊断[1,6-7,10-11,14]。粪类圆线虫(*Strongyloides stercoralis*)的幼虫是粪便样本中最常见的幼虫。根据患者的病情和粪便通过肠道的时间,杆状蚴和微丝蚴的存在可判断感染的情况。在进行幼虫培养时,由于感染性微丝蚴可能存在,操作需要谨慎。如果粪便的保存延迟,则可能存在含胚卵及钩虫的幼虫。粪便中幼虫的培养有助于:①以浓集方法检测时,虫体密度过低时验证其存在;②根据粪类圆线虫或钩虫卵孵化出的一期幼虫形态,来判断感染是否由这 2 种线虫引起;③使幼虫发育成微丝蚴以便进行进一步区分、鉴定。

粪便培养法对于钩虫轻度感染、粪类圆线虫、毛圆线虫属(*Trichostrongylus* spp.)和某些具有特性的寄生虫感染的检测非常实用。同时,该技术对于以研究为目的来获得大量感染期幼虫也是有用的。采用琼脂平板培养粪类圆线虫这一改良方法和其他培养技术在本章中也有描述。由于这些方法不常用,对其只进行简要的描述。

1. 粪类圆线虫的琼脂糖平板培养法 琼脂糖平板培养法(agar plate culture method)是培养粪类圆线虫幼虫的常用方法,该方法比其他检测方法更敏感[1,6-7,10-11]。将约 2 g 新鲜粪便[直径约 1 英寸(25 mm)]置于琼脂平板内,再将平板密封以防止污染,并置于室温下培养 2 天。随着幼虫爬过琼脂,它们携带细菌,从而在琼脂上可见明显的痕迹。将平板在显微镜下检查以确认幼虫的存在,然后用 10%福尔马林清洗琼脂的表面,幼虫的鉴定是通过湿片检查从福尔马林洗涤的沉淀物而确定。虽然是以琼脂平板培养幼虫为目的,但是任何容易观察到细菌菌落琼脂平板都可用。然而我们建议琼脂平板不要采用特别湿润的,以避免细菌聚集可能会掩盖琼脂表面。

2. 贝尔曼技术(Baermann technique) 改良贝尔曼法也常用于检测粪便样本中疑似少量粪类圆线虫的方法。贝尔曼技术采用一个漏斗形装置,漏斗与水管连接,并依靠活的幼虫从新鲜粪便样本(样本已在有纱布层的金属网上过滤)中移动为工作原理进行检测[1]。幼虫通过纱布进入水中,并沉积到装置的底部,该底部用于样本的收集和检测。该方法与 Harada-Mori 和培养皿法的主要不同在于贝尔曼法可用于大量新鲜粪便的检测,从而为轻度感染时幼虫的收集提供更好的途径。除了在患者粪便样本检查时采用该方法外,该技术还可以用于土源性线虫样本的检测。但是琼脂平板法被认为是收集粪类圆线虫幼虫更为敏感的方法。

3. Harada-Mori 滤纸条检测法(Harada-Mori filter paper strip culture) 滤纸条检测法在轻度感染的钩虫、粪类圆线虫和毛圆属线虫的检测及加快虫种鉴定时很有用[1,6-7,10-11]。该方法需要滤纸(裁剪成条状置于 15 ml 的检测管内)辅助,将新鲜粪便样本(大小为 1 粒葡萄干或小葡萄大小)加到检测管滤纸的中间来完成检测。通过给检测管加水(没过粪便样本的 1/2,但不能全部覆盖粪便)来给滤纸提供湿度,滤纸通过虹吸现象吸水。在适当的条件下,虫卵孵化和(或)幼虫进行发育。由于低温可能导致很多寄生虫发育能力的丧失,因此用来培养的粪便样本不可冷藏。同时,处理滤纸时也需格外谨慎,因为类圆线虫的幼虫可能会沿着滤纸条向上或向下移动。

4. 滤纸/斜面培养方法(培养皿)(filter paper/slant culture technique) 滤纸/斜面培养方法(培养皿)是培养粪类圆线虫(*Strongyloides*)幼虫的改良方法,该方法是将载玻片置于滤纸/斜面上进行培养[1,6-7,10-11]。在上述技术中,充足的湿度通过持续浸泡在水中的滤纸提供。新鲜的粪便样本置于滤纸上,根据标准载玻片的尺寸[1 英寸×3 英寸(2.5 cm×7.6 cm)]进行裁剪。滤纸随后被放置在一个倾斜的载玻片上,载玻片被放进盛了水的玻璃或塑料培养皿内。该技术可以直接用解剖显微镜检查来自于粪样或水体中的线虫幼虫和自由生活的粪类圆线虫,而无须取样。

(二)虫卵的研究和头节的寻找

1. 虫荷估计 只有人体寄生虫中的人蛔虫、鞭虫和钩虫(美洲钩虫及十二指肠钩虫)(*Necator americanus*, *Ancylostom aduodenale*)可被正确估计虫卵的产量和虫荷数评估。在具体病例中,准确的虫荷数信息在评估感染度、决定采用的治疗方法和评价药效时非常有用。在目前的治疗中,通过虫卵计数监测疗效不再重要。对于虫荷估算的方法在很多文献中都有相

关的记载[1,6-7,10]。

2. 血吸虫虫卵的孵化 当从尿或粪便中收集血吸虫虫卵时，需要对虫卵活性进行仔细的检查。卵内活毛蚴的存在表明感染需要治疗。毛蚴的活性可由以下两方面判定：①在生理盐水涂片中，火焰细胞（原始排泄细胞）的纤毛可在高倍非油镜下被观察到，且经常是活动的；②进行孵化时，毛蚴从虫卵中释放出来[1]，当放置在 10 倍体积的脱氯水或泉水中时（孵化与水接触后不久后就可能开始），虫卵通常在几个小时内孵化。尿（24 h 收集且不加防腐剂）中收集到的虫卵可通过沉淀法获得，并在显微镜下进行活力的鉴定。推荐使用带侧壁的烧瓶，但也可以使用锥形瓶。

由于成虫有时寄生在静脉而非正常寄生部位，所以尿和粪样都必须被收集。样本中不能添加防腐剂且在处理前无需经过冷藏。当盐分被去除且加入脱氯水后，孵化才能进行。如果进行粪便浓集法，则需要保留盐分以防止虫卵过早孵化。需要确保光线不能够离长颈烧瓶的侧壁或离锥形瓶顶层液面太近。过多的热量会杀死毛蚴。在水源上通过灯光来模拟阳光，可观察到毛蚴的孵化显示出趋光性。没有发现活的毛蚴并不能排除血吸虫虫卵的存在。死去的虫卵和不能孵化的虫卵不能通过该方法来检查。直接或浓集法镜检分别可用在有虫卵或没有虫卵的情况下。虫卵的活性检测是将粪样或尿沉淀（相同的样本采用烧瓶孵化）涂片后进行镜检。低倍镜（×100）可用来定位虫卵。高倍非油镜（×400）用来观察单个虫卵；火焰细胞（原始排泄系统）上活动的纤毛可用来判定虫卵的活性。

3. 绦虫头节的寻找 由于药物治疗对驱绦是非常有效的，所以很少需要寻找到绦虫的头节来确诊。但是为了鉴定虫种，在对粪便样本进行检测时，需要找到绦虫的头节和孕节。相关参考方法见文献[1][6-7]及[11]。

三、肠道内其他寄生虫的检查

（一）蛲虫的检查

蛲虫呈世界性分布，在儿童中最常见的蛲虫是蠕形住肠线虫，俗称蛲虫。这种线虫的雌虫常在夜间移行至肛门，并在肛门周围产卵。雌虫（长 8～13 mm）可在粪样表面或肛门周围的皮肤上被发现。由于虫卵常附着在肛门周围，在粪便中很难发现虫卵，所以蛲虫的检测就需要其他方法。蛲虫感染的诊断常依赖于典型虫卵的收集。蛲虫卵卵壳厚，长椭圆形，一侧扁平。虫卵内常含一发育成熟的胚胎，在产出后数小时内便具有易感性。可使用商业化的收集装置来进行样本的采集，方法与下文的胶带法相似[1]。许多临床医生常根据患者的临床症状进行治疗，而没有确诊是否有蛲虫感染。

透明胶带法和肛门拭子 蛲虫感染最常用的检查方法是胶带法（黏性的透明胶带）[1,9,12-13]。样本应在清晨采集，要在患者沐浴或如厕前进行。具体操作方法是将胶带黏于肛门皱褶上，取下后将黏性面贴于载玻片上镜检。判断患者未感染此病需要连续观察至少 6 张玻片，且均为阴性。目前，观察 6 张玻片被认为是不切实际的。如果儿童有症状，儿科医生通常会在没有虫卵确认的情况下开展治疗。肛门拭子也可用于蛲虫感染的检查[1]，但是大部分实验室喜欢采用胶带法，因为胶带不需要提前准备和储藏。

（二）乙状结肠镜检查（sigmoidoscopy material）

通过乙状结肠镜获得的病理样本是常规粪检不能采集到的，该方法对于阿米巴感染的诊断很有帮助。但是在进行乙状结肠镜检查前，通常要先进行 3 种常规的粪便检查[1]。

黏膜表面的病理样本应吸出或刮掉，且不能采用棉拭子采样。至少采集 6 个代表性的黏膜区域并进行检验（6 个样本，6 张玻片）。一般样本的量是有限的，要立即进行处理，以保证最好的检查（表 138-9）。3 种检查方法都可以进行。如果样本的量限制了只能采用一种方法，建议使用粪便固定剂对样本进行保存，以便后期的永久染色制片。

虽然粪便免疫法很少用于乙状结肠镜取样标本的检测，但是它们可用于溶组织阿米巴/迪斯帕内阿米巴的检测或致病性溶组织阿米巴的确诊。但是检测需要新鲜或冰冻的粪便样本；含防腐剂的粪便样本不可使用。

表 138-9 其他肠道样本中寄生虫的回收(parasite recovery from specimens)

来源	种类	方法[a]
乙状结肠镜检查标本		
未保存的	阿米巴(*Ameba*)滋养体(活力)	直接湿涂片法,免疫检测法[b]
干燥样本	球虫(*Coccidia*)	改良抗酸染色
	微孢子虫	改良三色染色,荧光增白剂,免疫检测法[c]
保存在5%~10%福尔马林或SAF或单瓶固定剂中的样本	蠕虫虫卵和幼虫(少用),阿米巴,鞭毛虫包囊[d]和滋养体(SAF或一种单瓶固定剂)	湿浓集法,免疫检测法
	球虫	改良抗酸染色,免疫检测法
	微孢子虫	改良三色染色,荧光增白剂,免疫检测法[c]
聚乙烯醇固定剂	蠕虫虫卵和幼虫(少用),阿米巴,鞭毛虫包囊[d]	湿涂片
	阿米巴,鞭毛虫包囊[d]和滋养体	永久染色涂片
绍丁固定剂	阿米巴,鞭毛虫包囊[d]和滋养体	永久染色涂片
十二指肠标本[e]		
未保存的	蠕虫卵和幼虫,贾第鞭毛虫滋养体(活力)	湿涂片
肠内检查胶囊[f]		
保存在5%~10%福尔马林或SAF或单瓶固定剂中的样本	蠕虫卵和幼虫,贾第鞭毛虫滋养体	浓集法,免疫检测法(根据确认的文件),永久染色涂片
肠内检查胶囊[f]	球虫	改良抗酸染色,免疫检测法
	微孢子虫	改良三色染色,荧光增白剂,免疫检测法[c]
包含聚乙烯醇的粪便固定剂	鞭毛虫滋养体	永久涂片染色
(黏合剂)肛门印片	鞭虫成虫和虫卵	无染色,透明胶带和其他的检测设备
成虫或节片	蠕虫成虫或节片	卡红染色(很少使用)、印度墨汁染色
组织活检样本	蠕虫虫卵,幼虫和成虫;原虫包囊;滋养体;卵囊;子孢子和孢子	压片,永久染色和病史

注:[a]某些寄生虫可以用分子生物学方法检测,采集方法(新鲜,Cary-Blair,单瓶防腐剂)将会有所不同,其中一些收集方法在应用于临床前需要进行内部验证。[b]溶组织阿米巴/迪斯帕内阿米巴或溶组织阿米巴的免疫学检测需要新鲜的或冰冻的粪便;存储的粪便不能用于检测。隐孢子虫和蓝氏贾第鞭毛虫(商业化试剂盒上的命名)的免疫学检测可使用粪便样本进行;其他肠道样本的免疫学检测(乙状结肠镜)依据样本的来源、黏度、体积来确认是否合适。[c]某些用于检测微孢子虫种特异性的免疫试剂是商业化的,但是未被美国FDA认可。[d]尽管在粪便中可以发现原虫包囊,但是通过乙状结肠镜可取得严重腹泻或痢疾患者的肠黏膜样本。在这些病例中,通常看不到包囊;滋养体可能是最常见的阶段,尤其是在溶组织阿米巴的病例中。[e]可通过穿刺获得十二指肠样本;在这样的病例中,要取够用于浓集沉淀的样本体积。如果仅有少量的直肠黏膜和(或)活检样本,这些样本需保存在绍丁固定液中。这种方法可能需要预涂白蛋白来促进固定。通过肠内胶囊获得的样本可当作新鲜样本来处理;胶囊的提线在收回后也应立即被放入防腐剂中,对于黏膜样本选择合适的固定剂固定后进行永久性染色涂片(含有或不含聚乙烯醇)。[f]肠内检查胶囊的商业获取性随着时间而变化,目前无在售商品

医生可能没有意识到在进行乙状结肠镜检查过程时选择合适固定剂的重要性,因为检查寄生虫时还会用到浓集和永久染色涂片法。建议提供一个寄生虫检测试剂盘(含有绍丁固定剂、聚乙烯醇、5%或10%福尔马林或单瓶固定剂),或者经过培训的检验师在进行乙状结肠镜检查时也同时准备病理片。

1. 直接生理盐水涂片 如果样本的收集时间没有延迟,并有显微镜可在附近使用,样本应采用直接生理盐水涂片以检查滋养体的存在[1]。将一滴样本与一滴0.85%的生理盐水混合后在低倍镜下观察阿米巴的活性。可能需要一段时间来使原虫适应这种检查,因此,活性在几分钟内可能观察不到。上皮细胞、巨噬细胞及可能出现的多形核白细胞(中性粒细胞)和红细胞的出现,则需要仔细的检查来观察是否有阿米巴感染。

由于原虫的特异性鉴定困难,只能采用生理盐水直接涂片法镜检,但可能会造成原虫漏检,因

此该技术仅在有充足样本时才能使用，以便留下足够的制作永久性染色涂片的样本。

2. 永久性染色涂片 大部分通过乙状结肠镜取得的样本可在载玻片上涂擦，并立即浸入 SAF 或单瓶固定剂中[1]。这些玻片可用三色染色或铁苏木素染色来检查特定的细胞形态、原虫或是其他微生物。操作程序和染色时间与常规粪便涂片的操作和染色是相同的。

(三)十二指肠内容物

1. 十二指肠引流术 十二指肠贾第鞭毛虫感染(即蓝氏贾第鞭毛虫或肠贾第鞭毛虫)或粪类圆线虫感染通过常规粪便检查可能找不到相关病原体。十二指肠引流物则可用于检查(表 138-8)[1]。

新鲜的未加防腐剂的样本应送往实验室；取样量从<0.5 ml 到几毫升。对样本进行离心(500×*g* 离心 10 min)并在液态环境中检查活动的原虫(碘液的加入以方便识别任何生物体)。如果样本不能在采样 2 h 内进行完全的检查，任何剩余的样本应加入固定剂以便进行永久染色。

如果十二指肠液中含有黏液，则容易在黏液中发现原虫。因此，样本的离心很重要，并且要对沉淀的黏液进行检查。贾第鞭毛虫的滋养体可能被包裹在黏液内，且滋养体鞭毛的运动可能是唯一可见的细微运动。粪类圆线虫的幼虫通常是活动的。隐孢子虫和十二指肠贾第鞭毛虫(蓝氏贾第鞭毛虫或肠贾第鞭毛虫)的免疫学检测也需要新鲜的或福尔马林固定的样本，但在许多产品的说明书中，十二指肠液未被列入可检测的样本范围内。

如果从十二指肠采集的样本很少，不能采用湿涂片检查，需要进行永久性涂片检查。该方法可提供更为永久的记录，潜在问题是染色的生物较少活动，用高放大倍数(×1000)的油镜观察染色样本可以替代低放大倍数镜检。

2. 十二指肠胶囊技术(肠内检测) 十二指肠内容物采样已无须使用肠内插管法，而采用内部盘绕尼龙丝明胶的胶囊法[1,6-7,11]来完成。尼龙线突出于胶囊的一端，线的末端被贴于患者脸部的一侧。之后胶囊被吞下，明胶在胃内溶解，加重的线随着胃肠道的蠕动进入十二指肠内。通常 60 min 后线被取出。带有胆汁颜色的黏液附着在尼龙线上，应立即进行湿涂片检测活的寄生虫。

如果样本在采样后 1 h 内不能完成检测，需将其保存到 SAF 或单瓶固定剂或含有聚乙烯醇的固定剂中，同时需要准备黏液涂片。然而目前，成人和儿童的胶囊都已停产，这种现状以后可能会有所改善。

四、泌尿系统样本

有些寄生虫样本可从泌尿系统中采集，并通过尿来检测。尽管最常见的泌尿系统寄生虫可能是阴道毛滴虫(*Trichomonas vaginalis*)和埃及血吸虫(*S. haematobium*)，而其他寄生虫如微孢子虫也偶尔被检测到(表 138-10)。另外，用于回收微丝蚴的过滤膜可用尿样本检测。

表 138-10 泌尿系统寄生虫的检测

寄生虫(S)	方法
阴道毛滴虫	湿涂片(活力)
	培养
	吉姆萨染色(如果是干燥的涂片，先用无水甲醇进行预固定，并在染色前将其晾干)
	直接荧光抗体
	DNA 探针
	乳胶凝集
	酶联免疫吸附
	快速免疫层析法(试纸条)

（续 表）

寄生虫(S)	方法
曼氏血吸虫(*S. haematobium*)	湿涂片(尿样本) 膜过滤 组织切片[预压片和(或)组织切片]
微丝蚴(*Microfilariae*)	梯度离心 膜过滤(核孔过滤器) 吉姆萨染色 Delafield 苏木素染色
微孢子虫	改良三色染色[a] 荧光增白剂[a] 免疫检测[a,b] 常规组织学 电子显微镜或分子生物学鉴定种属进行

注：[a] 染色方法和荧光抗体实验采用离心沉淀物进行（500×*g*，10 min）。[b] 免疫试剂是商业化的，但未被 FDA 认可

(一)直接生理盐水涂片(direct wet mount)

在阴道毛滴虫的鉴定中，从潮湿的阴道和尿道排泄物及前列腺分泌物或尿沉渣中进行样本的采集，可能需要多个样本的检查以确诊。将这些样本用生理盐水稀释，采用低倍镜镜检和降低照明度以显示活动生物体的存在。随着急速运动的减少，可能会观察到毛滴虫的波动膜，尤其是在高倍非油镜下(放大倍数，×400)。但是湿片法检测敏感性低[1]，目前，分子检测体系越来越普遍且其检测敏感性较高。

膜过滤技术可用于收集微丝蚴，检查尿沉淀来鉴定是否存在丝虫感染。在非洲盘尾丝虫(*Onchocerca volvulus*)的感染中，尿中微丝蚴出现的频率越来越高。膜过滤技术详细的操作流程参见文献[1,6-7,10-11]。

膜过滤技术也可用于尿中埃及血吸虫卵的检查[1]。该方法采用 25 mm 的滤过膜(5μm 孔径)[1,6,10-11]。

在鉴定阴道毛滴虫时，无须采用染色涂片法。曾有许多关于在染色涂片基础上出现的假阳性和假阴性结果的数据，建议使用直接涂片法观察来自适当培养基[1,6-7,10]中的活动生物体，或直接通过免疫检测来判定是否存在感染的可能性[1]。

将膜过滤方法获得的微丝蚴样本进行涂片染色，可以使用 Delafield 苏木素或吉姆萨染色。值得注意的是，吉姆萨染色不能将翅鞘染色。要正确鉴定寄生虫的种类，可能需要苏木素染色。

某些微孢子虫感染也能采用尿沉渣来进行检测。尿沉渣通过改良三色染色或光学增亮剂，如荧光增白剂染色[1]。确诊还需要多种检测方法的联合使用。建议对任何疑似微孢子虫感染的患者进行粪便和尿检查。

(二)培养(culture)

用作培养的女性样本(用于阴道毛滴虫检测)包括阴道分泌物，可用棉签蘸取阴道后穹窿收集渗出物或用聚酯海绵吸取生殖器分泌物。男性样本包括吸到聚酯海绵上的精液、尿道样本或尿。应采集患者的晨尿样本。至关重要的是，临床标本应在收集后尽快接种到培养基中[1,13]。另一种方法是采用塑料膜封方法[毛滴虫培养系统(Empyrean Diagnostics，Mountain View，CA)或 InPouchTV (BioMedDiagnostics，SanJose，CA)]，该方法所涉及的样本运输和培养操作较为简便[4]。在临床上常采用阴道毛滴虫 ATCC30001 虫株作为培养时的标本对照株，用作阴道毛滴虫分离株培养的培养基有很多种，有一些是非商业化的且有相当长的贮存期限，尤其是塑料膜封法。

如果孵育 4 天后还是看不到滋养体，则需丢弃培养管并报告培养结果为阴性。患者样本的培养结果在对照株培养为阳性前不应判定结果是阳性。由于培养时间为 3～4 天，临床样本可能包含死亡的原虫，建议同时进行湿涂片镜检(尽管观察较为困难，死亡的原虫可能存在)。

(三)抗原检测(阴道毛滴虫)

培养是诊断毛滴虫病最敏感的方法;但是,由于时间和精力有限,一些实验室采用新型免疫试剂盒进行检测[1]。Osom 毛滴虫快速检测试剂(Genzyme Diagnostics,Cambridge,MA)是将抗原点于试纸片上,进行免疫层析来完成检测的。结果可在 10 min 内判定,根据生产商声明,该方法与参考方法(培养和湿涂片法)的检测一致性达到 95%。Affirm VPⅢ DNA 探针技术(Becton,Dickinson and Co.,Franklin Lakes,NJ)为引起阴道炎的 3 种病原体[念珠菌(*Candida species*)、阴道加德纳菌(*Gardnerella vaginalis*)和阴道毛滴虫]的检测提供了可靠且快速的方法。同时 APTIMA(GenProbe,San Diego,CA)阴道毛滴虫检测方法也是可用的,其他的分子检测方法参见表 138-7。

五、来自身体其他部位的采样

以上寄生虫感染有的可以使用分子生物学方法检测;分子检测通常会更灵敏,特别是当临床标本中寄生虫含量较低时。当常规检测方法未能鉴定感染的生物体时,穿刺样本的检查对于寄生虫感染的诊断可能是极有价值的(表 138-11)。穿刺取得的样本需在采集后立即送往实验室。穿刺样本包括从不同部位采集的样本,分为针筒抽取液和十二指肠穿刺液。针筒抽取通常是由负责细胞病理学检查的工作人员进行采样,样本被直接送往实验室进行涂片和(或)培养。液体样本通过气管镜采集,包括支气管肺泡灌洗和支气管的洗液。

表 138-11 可能感染寄生虫的样本回收和适合的检测方法(除肠道采集的样本外)[a]

身体的部位	样本	可能感染的寄生虫	试验
骨髓	穿刺	利什曼原虫属(*Leishmania* spp.)、克氏锥虫(*T. cruzi*)、疟原虫属、刚地弓形虫	吉姆萨染色、培养(如果有关)早期或晚期感染诊断可用敏感的 PCR 技术
脑	组织活检,脑脊液	耐格里原虫属、棘阿米巴属、匀变虫属	吉姆萨染色、三色染色、培养、PCR 种属鉴定
		狒狒巴拉姆希阿米巴、溶组织阿米巴	吉姆萨染色、三色染色
		刚地弓形虫	吉姆萨染色、特异性免疫试剂、培养、PCR
		微孢子虫[脑炎微孢子虫属(*Encephalitozoon* spp.),毒害糙多孢微孢(*Trachipleistophora anthropophthera*)]	改良三色染色、抗酸染色、吉姆萨染色、荧光增白剂、组织学[b](亚甲基四胺银,PAS,组织革兰染色)、PCR、电子显微镜
		猪带绦虫(囊尾蚴)(*Taenia solium* (*cysticerci*)),棘球绦虫属(*Echinococcus* spp.)	常规组织学[b]
眼	角膜,结膜,隐形眼镜,隐形眼镜护理液	微孢子虫目(脑炎微孢子虫属、糙多孢微孢子虫属、Anncaliia spp.、小孢子虫属、微孢子虫属)	抗酸染色、吉姆萨染色、改良三色染色、亚甲基四胺银、荧光增白剂、组织学[b](亚甲基四胺银、PAS、组织革兰染色)、电子显微镜
		棘阿米巴属	吉姆萨染色、三色染色、培养、荧光增白剂(仅用于包囊)、PCR 种属鉴定
		刚地弓形虫	吉姆萨染色、特异性免疫试剂、培养
	幼虫或成虫	罗阿丝虫属(*Loaloa*)、双瓣线虫属(*Dipetalonema*)、*Thalezia*、犬恶丝虫(*Dirofilaria immitis*)、颚口线虫属(*Gnathostoma* spp.)、犬弓首蛔虫(*Toxocara canis*)、猪带绦虫(囊尾蚴)、棘球绦虫属	直接检查、常规组织学[b]
肾,膀胱	蝇类幼虫,虱的成虫	蝇蛆(Myiasis),虱(lice)侵染	直接检查
	活检样本	微孢子虫(脑炎微孢子虫属,毒害糙多孢微孢子虫)	改良三色染色、抗酸染色、吉姆萨染色、荧光增白剂、组织学[b](亚甲基四胺银、PAS、组织革兰染色)、电子显微镜

（续 表）

身体的部位	样本	可能感染的寄生虫	试验
肝，脾	蠕虫成虫，虫卵	日本血吸虫(*S. haematobium*)	直接检查
	穿刺和活检样本	肾膨结线虫(*D. renale*)	直接检查
		棘球绦虫属	湿涂片、常规组织学[b]
		华支睾吸虫属(*Clonorchis* sp.)，后睾吸虫属(*Opisthorchis* spp.)，肝毛细线虫(*Capillaria hepatica*)，犬弓首蛔虫(*T. canis*)，猫弓首蛔虫(*T. cati*)	常规组织学[b]
		刚地弓形虫，杜氏利什曼原虫(*Leishmania donovani*)	吉姆萨染色、培养
		隐孢子虫	改良抗酸染色、特异性免疫试剂
		微孢子虫(脑炎微孢子虫属，毒害糙多孢微孢子虫)	改良三色染色、抗酸染色、吉姆萨染色、荧光增白剂(荧光增白剂)、组织学[b](亚甲基四胺银、PAS、组织革兰染色)、电子显微镜
		溶组织内阿米巴[a](*E. histolytica*[a])	湿涂片、三色染色
淋巴结，淋巴系统	穿刺和活检样本	刚地弓形虫、克氏锥虫、布氏锥虫罗德西亚属(*T. brucei rhodesiens*)、布氏锥虫冈比亚亚属(*T. brucei gambiense*)	直接检查、常规组织学[b]、吉姆萨染色、培养
		微孢子虫	改良三色染色、抗酸染色、吉姆萨染色、荧光增白剂(荧光增白剂)、组织学[b](亚甲基四胺银、PAS、组织革兰染色)、电子显微镜
		班氏吴策线虫属(*Wuchereria bancrofti*)、马来布鲁丝虫(*Brugia malayi*)、布鲁丝虫(*Brugia* spp.)	厚血膜、浓集法、膜滤过
肺	痰液(吐出或诱导)，支气管肺泡灌洗液、支气管穿刺液、刷拭活组织检查、开放肺组织活检标本	似蚓蛔线虫、粪类圆线虫、钩虫、并殖吸虫属(*Paragonimus* spp.)，细粒棘球绦虫	湿涂片、常规组织学[b]
		微孢子虫(脑炎微孢子虫属，毒害糙多孢微孢子虫)	改良三色染色、抗酸染色、吉姆萨染色、荧光增白剂(荧光增白剂)、组织学[b](亚甲基四胺银、PAS、组织革兰染色)、电子显微镜
		刚地弓形虫	吉姆萨染色、特异性免疫试剂、培养
		隐孢子虫	改良抗酸染色、特异性免疫试剂
	唾液	属齿龈内阿米巴(*E. gingivalis*)，口腔毛滴虫(*T. tenax*)	三色法
肌肉	活检标本	旋毛虫属(*Trichinella* spp.)	湿涂片、压片、常规组织学[b]
		微孢子虫(脑炎微孢子虫属，毒害糙多孢微孢子虫)	改良三色染色、抗酸染色、吉姆萨染色、荧光增白剂(荧光增白剂)、组织学[b](亚甲基四胺银、PAS、组织革兰染色)、电子显微镜
		肉孢子虫(*Sarcocystis* spp.)、浣熊贝蛔虫(*Baylisascaris procyonis*)、钩虫属(*Ancylostoma* spp.)、猪带绦虫(囊尾蚴)、多头绦虫属[多头蚴 *Multiceps*(*coenurus*)]、棘球绦虫属、迭宫绦虫属[无头蚴 *Spirometra* (*spargana*)]、旋盘尾丝虫(结节)[(*O. volvulus* (*nodules*)]、颚口线虫属(*Gnathostoma* spp.)、克氏锥虫(*T. cruzi*)	常规组织学[b]
鼻咽，窦腔	刮片，活检标本，穿刺标本	微孢子虫(脑炎微孢子虫属，毒害糙多孢微孢子虫，人气管普孢虫)	改良三色染色、抗酸染色、吉姆萨染色、荧光增白剂(荧光增白剂)、组织学[b](亚甲基四胺银、PAS、组织革兰染色)、电子显微镜
		棘阿米巴属	吉姆萨染色、三色染色、培养、荧光增白剂(仅限于包囊)

（续 表）

身体的部位	样本	可能感染的寄生虫	试验
		耐格里原虫属	吉姆萨染色、三色染色、培养
		利什曼原虫属	吉姆萨染色、培养
直肠组织	刮片，穿刺标本，活检标本	曼氏血吸虫，日本血吸虫	直接检测
皮肤	皮肤切片	旋盘尾丝虫，链尾曼森线虫	吉姆萨染色、常规组织学[b]
	刮片，穿刺标本，活检标本	利什曼原虫属	吉姆萨染色、培养、常规组织学[b]
		棘阿米巴属	吉姆萨染色、三色染色、荧光增白剂（仅限于包囊）
		溶组织内阿米巴，血吸虫属	常规组织学[b]

注：[a] 该表不包括可能在身体特定的部位中发现的寄生虫。寄生虫发育阶段包括滋养体、包囊、卵囊、孢子、成虫、幼虫、虫卵、小钩、无鞭毛体和鞭毛体。尽管 PCR 方法已在表中大多数虫种的研究中应用，但检测试剂并不是商业化的。[b] 常规组织学可用于许多寄生虫的检测和鉴定。在某些情况下，它可能是诊断的唯一手段。[c] 虽然在检测眼部寄生虫时，眼部标本为优先选择，但是也有从患者的隐形眼镜及护理液中培养自由生活的阿米巴相关病例报道；我们不拒绝接收这些标本。一个例外是未开封的商业镜片护理液；这样的护理液将被拒绝检测。[d] 在脓肿穿刺液中检查阿米巴滋养体的存在是不常用的方法，然而诊断肠外阿米巴病时该方法并不可靠，应优先选用血清学试验

检测溶组织阿米巴感染时进行的乙状结肠镜检查和刮片操作的细节，以及十二指肠穿刺取材的过程在本章已有介绍。

组织中有寄生虫感染的诊断需要采集活检标本（表 138-11）。除了标准的组织学制片外，也可采用以下方法：来自皮肤、肌肉、角质层、肠道、肝、肺和脑组织的活检印片和压片。组织需要被固定以便进行检查。通过电子显微镜检查要在实验室内完成，对组织进行处理，在某些疑似寄生虫的感染中进行活检。样本要在新鲜时检测而不是用组织切片来检测，这就要求需将样本置于生理盐水中保持湿润并立即送往实验室。

组织中的寄生虫检测取决于标本的采集。活检样本通常较小且不能代表病变组织。多样化的组织取材能提高诊断结果。为了优化来自任何组织标本的检测，尽可能进行全面检测和采用多种方法进行检测。以有创方式取得的组织有很多都是珍贵的，对于这些样本更要尽可能地进行最综合的检查。

组织被置于吸有生理盐水的无菌海绵的无菌容器内，送往实验室进行直接涂片后培养或压片染色。如果要进行寄生虫的培养，要采用无菌涂片，并在涂片前进行接种培养。

各种体液（尤其是腹膜和羊水，还有呼吸系统标本）中都可以看到分离的睫状体簇（纤毛细胞变性崩解）。这些丛状上皮是纤毛上皮的一部分，在呼吸道和鼻窦、脑室、脊髓中央管和男女生殖道上皮等许多部位被发现是正常细胞更新的一部分。簇状体是活动的，直径 10～15 μm，可以与纤毛或鞭毛原生动物混淆。然而，涂片镜检时它们并没有像原生动物那样的内部结构[1]。

（一）骨髓

骨髓穿刺可用于利什曼原虫（*Leishmania*）无鞭毛体、克氏锥虫（*T. cruzi*）无鞭毛体（非洲锥虫病与此无关）、疟原虫（*Plasmodium* spp.）或弓形虫（*Toxoplasma gondii*）（查此病原一般不用骨髓样本）的检测，该方法需要辅以吉姆萨染色。但是如果使用铁苏木素/吉姆萨联合染色或其他血细胞染色，上述原虫也是在染色后被观察到。如果样本需要进行寄生虫培养，在样本接种到培养基前要保持无菌状态。接种到适当的培养基后，剩余的标本可进行涂片和染色分析。

（二）脑和脑脊液

通常当接受脑脊液或脑组织活检标本时，最有可能感染的寄生虫包括自由生活的阿米巴-棘阿米巴属（*Acanthameba* spp.）、狒狒巴拉姆希阿米巴（*Balamuthia mandrillaris*）、福氏耐格里原虫（*Naegleria fowleri*）或匀变虫属（*Sappinia* spp.）。被棘阿米巴属和福氏耐格里原虫的培养建议使用非营养琼脂培养基（细菌覆盖）；已知微生物阳性的质控培养可作为解释患者样本培养结果的依据。匀变虫属也可在覆盖细菌的非营养琼脂培养基上生长。培养来自中枢神经系统的自由生活的阿米巴原虫，琼脂板要先在 37℃ 上预热（室

温，无 CO_2）[1,6-7,10]。不幸的是，狒狒巴拉姆希阿米巴的培养比较困难；如果怀疑该寄生虫感染的话建议咨询疾病预防控制中心。其余样本进行涂片和染色。尽管刚地弓形虫在染色时可见，但仍需要进行特殊的免疫学、细胞培养或PCR方法进行诊断。脊髓液在检查前不能被稀释。检测过程中还需要准备组织印片并进行印片染色，与血液染色一起进行。将样本置于两张载玻片之间，再将玻片打开，印片就可完成（两玻片交叉错开）。该印片可在室温干燥，随后进行染色，步骤与薄血膜染色过程相同（用无水甲醇固定，与血片染色过程相同）。

原发性阿米巴脑膜脑炎患者是罕见的，但脊髓液的检查可能会揭示阿米巴感染，而且通常是福氏耐格里阿米巴。将未离心沉淀的脊髓液涂于载玻片上，加以盖玻片，观察活动的阿米巴；涂片可采用三色染色法、瑞氏染色或血片染色。可采用光学相差显微镜检查脊髓液、渗出液和组织碎片。注意不要将白细胞和寄生虫混淆。在感染早期，脊髓液可能是澄清的、呈现云雾状或脓性的（有或无红细胞），细胞计数从几百到超过20 000个白细胞（主要是中性粒细胞）/ml。如在这类脊髓液中未能找到细菌，应警惕有阿米巴脑膜脑炎的可能性；但是，在许多报道中由于过量碎片致革兰染色假阳性细菌的描述。从组织中分离的这些微生物可用特殊的培养基进行培养。当脑脊液被置于计数板时，微生物多聚积于计数板的底部且堆积在一起，看起来非常像白细胞。鉴于此原因，脊髓液最好直接涂于载玻片并加盖玻片进行检查，而不用采用计数板。

也应考虑可能是微孢子虫感染（最有可能的生物体是脑炎孢虫属，糙多孢微孢子虫是不常见的）。特殊检测方法包括改良三色染色、抗酸染色和血片染色；非特异性光学增白剂（荧光增白剂）；常规的组织学[乌洛托品银、过碘酸-希夫（染色反应）（PAS）和组织革兰染色]及电子显微镜检查。在鉴定微孢子虫的种属时需借助电子显微镜或特殊的免疫试剂。蠕虫，如对猪带绦虫（囊尾蚴）和细粒棘球绦虫包囊的检查可采用常规的组织切片；但包虫病的确定还需根据包囊液中的小钩来确诊。

（三）眼睛

眼部的样本来自角质层、结膜、隐形眼镜或镜片护理液。尽管上述的眼部组织都是采样的优选部位，但棘阿米巴属也曾在隐形眼镜和镜片护理液中被培养出来。这种样本是可以接受的，但是由于管理风险问题，实验室不应接受未开封的商业镜片护理液。这些护理液可被送往专业实验室或机构，如美国FDA，进行检测和商业产品的批准。棘阿米巴在镜片护理液中的出现并不等于患者一定有阿米巴结膜炎，该结果只能作为一个提示。建议使用角膜刮片，在选择适合的培养基接种后，需对样本涂片进行血涂片染色或三色染色。尽管刚地弓形虫在染色片中可见，还需要采用特殊的免疫试剂或PCR方法确诊。大部分感染刚地弓形虫的患者并不表现出眼部疾病，但是两类人群是易感的，HIV免疫缺陷患者和因母亲急性感染经胎盘传播的婴儿。

此外，眼部易感染微孢子虫，其特殊检测方法包括改良三色染色、抗酸染色和血片染色；非特异性光学增白剂（荧光增白剂）；常规的组织学[乌洛托品银、过碘酸-希夫（染色反应）（PAS）和组织革兰染色]和电子显微镜检查。在鉴定微孢子虫的种属[脑类微孢子虫属（*Encephalitozoon* spp.）、粗糙多孢微孢子虫属（*Trachipleistophora* spp.）、微粒子虫属（*Nosema* spp.）、*Vittaforma* spp.、条纹微孢子虫属（*Anncaliia* spp.）和微孢子虫属（*Microsporidium* spp）]时需借助电子显微镜或特殊的免疫试剂。眼部感染经常出现在具有免疫能力且没有其他潜在疾病的患者身上。在革兰染色和细胞学检查中，尤其在培养板为阴性的情况下，区分微孢子虫的孢子和革兰染色涂片中的细菌是非常重要的，两者在形态上经常被混淆。

由线虫引起的眼部疾病包括盘尾丝虫病、罗阿丝虫病、恶丝虫病、颚口线虫病、泰勒虫病和弓首蛔虫病。盘尾丝虫病的诊断可通过观察角膜取样中的微丝蚴或多处皮肤样本的镜检而确诊。罗阿丝虫病的确诊需要检测罗阿丝虫在血液中产生的循环微丝蚴或直接观察成虫。

眼部寄生虫病可由犬恶丝虫幼虫移动至眼眶周围或眼睑周围而引起的，但是很少对该感染进行实验室诊断。颚口线虫和弓首蛔虫感染的诊断是依据标志性嗜酸性粒细胞的增加和IgE的上升来判断。在内脏和眼幼虫移行的病例中，血清学试验有助于对弓首蛔虫病的诊断。有条件的话建

议选择分子检测，这种方法更加敏感。

眼部疾病也可由绦虫引起，包括猪带绦虫（囊尾蚴病）和棘球绦虫属（包虫病）。这些感染可通过直接的眼部检查发现猪带绦虫的幼虫和X线断层扫描发现包虫的包囊，或进行常规的组织切片来诊断。

眼部蝇蛆病和虱感染也可能存在；实验室工作人员需要鉴定各种蝇蛆[皮蝇属（*Dermatobia*）、胃蝇属（*Gasterophilus*）、狂蝇属（*Oestrus*）、瘤蝇属（*Cordyl obia*）、金滴虫（*Chrysomia*）、污蝇属（*Wohlfahrtia*）、锥蝇属（*Cochliomyia*）和皮影属（*Hypoderma*）]和（或）虱（*lice*）[体虱（*Pediculus humanus corporis*）或（*P. humanuscapitis*）有记载，但少见]或阴虱属[阴虱属（*Pthirus*）更常见]或蠕形螨属[（*Demodex* spp.）（睑缘炎）]。

（四）肾和膀胱

肾是肾膨结线虫（*D. renale*）成虫寄居的主要脏器。该虫通常生活在右侧肾盂或体腔内。全球范围内仅在犬体内发现了该虫的感染，在人体是不常见的。尸检证实，该虫从尿道迁移，通过肾脓肿处的皮肤释放，或虫卵随尿排出。

是否存在微孢子虫的感染[最可能的物种是脑内微孢子虫属；较少见的是毕氏肠上皮细胞微孢子虫（*Enterocytozoon bieneusi*）]是需要确认的。特殊的方法包括改良三色染色、抗酸染色、血片染色；非特异性增白剂（荧光增白剂）；常规的组织学[乌洛托品银、过碘酸-希夫（染色反应）（PAS）和组织革兰染色]和电子显微镜检查。在鉴定微孢子虫的种属时需借助电子显微镜或特殊的免疫试剂。

在膀胱壁黏膜上可能会发现埃及血吸虫的虫卵（组织压片），这些虫卵并未在尿中出现。应对膀胱壁上的虫卵通过孵化技术或镜检观察毛蚴功能性火焰细胞来检查其活性；孵化检查法最适合于尿样本的检查[1]。

（五）肝和脾

尽管肝和脾是许多微生物的次要寄居脏器，但这2个脏器是某些寄生虫的主要寄生部位，例如，杜氏利什曼原虫、刚地弓形虫、棘球绦虫属、犬弓首蛔虫、猫弓首蛔虫、肝毛细线虫、华支睾吸虫属、后睾属（*Opisthorchis* spp.）、隐孢子虫属、溶组织内阿米巴、脑类微孢子虫属和脑胞内原虫属（肝）[*E. intestinalis*（liver）]。典型的诊断方法包括湿片法、常规组织学分析、血片染色、培养、改良抗酸染色、免疫试剂检测、常规或者改良的三色染色法。肺或肝脓肿的穿刺液检查可能提示溶组织阿米巴滋养体的存在，但虫种的鉴定通常比较困难[1]。肝穿刺的样本应采取脓肿周边的组织而不是坏死中心的部位。病原体常常被黏性脓液或碎屑包裹，不表现出典型的活性。最少应除去2个单独部位的渗出物（建议多于2个）。前一部分的穿刺液通常是淡黄色的，很少包含微生物；后一部分的脓肿穿刺液是红色的，更可能含有阿米巴。待检样本最好取自于脓肿壁。南非约旦的阿米巴研究联盟认为可采用蛋白水解酶使病原体从穿刺样本中释放出来。

在稠厚的脓液中加入链球菌脱氧核糖核酸酶（10 U/ml），将混合物在37℃下振荡孵育30 min。离心（500×*g*，5 min）后，将沉淀物制成湿涂片镜检或者用培养基进行培养。某些穿刺液可直接与聚乙烯醇在载玻片上混合并制成永久性染色涂片后镜检[1,22]。在肠道外阿米巴疑似病例的检测中，许多实验室更倾向用血清学诊断方法。

用于诊断包虫病而进行的包囊穿刺一般采用推荐的经皮肤穿刺、注射和再灌注方法。经证实，囊肿穿刺是安全的，尤其是在放射学的指导下。穿刺液通常包含棘球砂（完整且退化的头节、小钩和石灰小体）。一些陈旧的包囊包含了类似于凝结的奶酪样物，小钩也很难被观察到。可对这些样本用盐水或10%的KOH或浓盐酸稀释，通常头节或具有危险性的包囊会被溶解。然而，可通过在高倍非油镜下或特殊的染色观察小钩存在与否来进行诊断（放大倍数，×400），或使用特殊的染色进行。头节或小钩的缺失并不能排除包虫病感染的可能性，由于有些囊肿是无菌的，并且不包含头节和（或）子包囊。包囊壁的组织学检查可以用来确诊。

可以使用常规组织学、培养和分子检测方法来确诊肝、脾利什曼原虫病；培养和分子检测方法可在疾控中心获取。

（六）肺

咳出痰及诱导痰（expectorated and induced sputum） 尽管咳出痰不是较为常见的检测样本，

但也可进行寄生虫的检查(表 138-11)。痰中的微生物也需要检测,这些微生物可能引起肺炎或吕弗勒综合征(Loeffler's syndrome),包括移行阶段的蛔虫、粪类圆线虫、钩虫、并殖吸虫的虫卵、细粒棘球绦虫的小钩、溶组织阿米巴原虫和隐孢子虫;也可能是微孢子虫[1]。在并殖吸虫感染中,痰呈现黏性且略带褐色斑点("铁锈样"),这是虫卵聚集所导致的,并可能出现血丝。尽管痰中可能发现齿龈内阿米巴和口腔毛滴虫,这 2 种病原体的出现只是口腔卫生差或牙周疾病所引起的,而非肺部疾病。

痰样品应合理收集,以便于实验室获得的是从下呼吸道采得的"深痰"样品而不是从口腔中得到的唾液样本。如果痰不是通过诱导产生的,患者应该接受对收集具体说明的培训。

应注意不要将口腔和唾液中发现的齿龈内阿米巴与导致误判肺脓肿的溶组织内阿米巴混淆。齿龈内阿米巴通常包含消化了的中性粒细胞,而溶组织阿米巴可能包含消化了的红细胞而不是中性粒细胞。口腔毛滴虫也可在唾液中被发现,但这种出现可能是偶然性的而非肺部问题。

(七)直接湿涂片法

通常对痰采用湿涂片法检查(盐水或碘液),进行低倍镜和高倍镜镜检(放大倍数分别为×100和×400)。样本在进行湿涂片前不需要离心。如果痰较浓厚,需加入等量的 3% 氢氧化钠(或未稀释的氯漂白剂),将样本充分混合后离心,但是氢氧化钠会杀死可能存在的原虫滋养体。离心后,弃去上清液,沉淀采用盐水或碘液湿涂片法检测。如检测由于任何原因而延误,应对痰采取 5%或10%的福尔马林固定其中的蠕虫卵或幼虫,或加入粪便固定剂保存原虫。另一选择是使用含有二硫苏糖醇的试剂产品,如 Sputaso 1(OxoidCode SR0233A; Remel, Lenexa, KS)。Sputasol 可分解黏液,释放其中包裹着的微生物而不将其杀死。

(八)永久染色涂片

如果怀疑隐孢子虫属感染(较少见),可以使用与粪便样本类似的检测方法,如抗酸染色或免疫检测[1]。三色染色或铁苏木素染色的样本可帮助区分溶组织阿米巴和齿龈内阿米巴,吉姆萨染色则能更好地用来鉴定幼虫和未成熟的蠕虫。

支气管抽吸物(bronchoscopy aspirates) 通过支气管镜收集的液体可能是灌洗液或冲洗液,其中支气管灌洗液是采样首选。在染色镜检前,样本通常经由离心来浓集。并殖吸虫属、粪类圆线虫、刚地弓形虫、隐孢子虫属和微孢子虫都可用上述方法检测。

如果怀疑弓形虫感染,确诊需要进行血液涂片、特异性免疫检测和(或)培养(组织培养)。大量的细胞系(人包皮成纤维细胞)已经被使用,常用的细胞系能很好地用来维系原虫的生长和分离。

(九)淋巴结和淋巴系统

来自于淋巴结和淋巴系统的样本也可能需要确认是否存在寄生虫感染(弓形虫病、恰加斯病、锥虫病、微孢子虫病或丝虫病),具体检测步骤如下:对液态样本进行湿涂片后(生理盐水稀释),在低倍镜(放大倍数,×100)和高倍非油镜(放大倍数,×400)下观察活动原虫的存在。

从淋巴结采集的样本应进行组织切片和印片(制作过程与薄血膜相同),并选取一张按照血涂片染色法进行染色。适合的培养基也可用于样本的培养,样本采集需要在无菌条件下进行。

如果怀疑微孢子虫感染,需采用改良三色染色法、荧光增白剂法和免疫法(目前正在研发)[1]。如怀疑刚地弓形虫感染,可采用吉姆萨染色、特异性免疫检测和(或)培养(组织培养)来确诊。

丝虫感染通常由班(克罗夫特)氏吴策线虫、马来丝虫和布鲁丝虫引起。在多数病例中,采集微丝蚴并经过厚血膜涂片、特异的浓集沉淀和(或)膜滤过来进行虫种的鉴定[1]。

(十)肌肉

肌肉是以下病原体的主要寄居部位:肉孢子虫属(*Sarcocystis* spp.)、微孢子虫(具褶孢虫属(*Trachipleistophora hominis* 或 *Nosema* spp.)、颚口(线)虫属、旋毛虫属幼虫和绦虫幼虫[多头蚴属(带绦虫属)、囊虫(猪带绦虫)和裂头蚴属]。克氏锥虫无鞭毛体主要见于心脏和(或)骨骼肌中。浣熊拜林蛔线虫(*B. procyonis*)、钩口线虫属(*Ancylostoma* spp.)和包虫的包囊(细粒棘球

绦虫属)也可在肌肉中检测到。在大多数病例中,对活检标本需采用常规的组织学检查,这种检查将为病原体的检测和确认提供最合适的样本。

旋毛虫病的初步诊断通常根据患者的病史:生食猪肉、海象肉、熊肉或马肉;腹泻、水肿和肌肉酸痛;嗜酸性粒细胞的出现。通常无法获取可疑食物进行检查。确诊需要找到肌肉活检标本中的旋毛虫幼虫。如将小块的肌肉切片夹在两片载玻片中进行镜检,可在新鲜的肌肉中找到幼虫包囊[1]。通常在横膈、咬肌或舌中幼虫最多,这些样本能从尸检的肌肉中找到,并制作常规的组织学切片。

人感染任何绦虫的幼虫都可能存在诊断的问题,且幼虫经常需要手术切除后鉴定[1]。除了细粒棘球绦虫和猪带绦虫幼虫(囊尾蚴),其他绦虫幼虫偶尔对人类致病。多头绦虫属的带绦虫幼虫寄生于狗和野犬体内,被称为多头绦虫(*Multiceps*),可能会引起人体多头蚴病。多头蚴类似囊尾蚴,但是更大且有多个头节,在充满液体的包囊的外膜上生长。这些幼虫寄生在肠内、眼、中枢神经系统和肌肉。

人体裂头蚴病是由迭宫绦虫属绦虫(*Spirometra*)的幼虫引起的,该绦虫的幼虫寄生于犬科和猫科动物;该绦虫与裂头属绦虫非常相似。裂头蚴狭长,幼虫带状且没有包囊,前端略扩展,缺乏吸盘。该幼虫常在浅表组织或结节中被找到,但是它们可引起眼裂头蚴病,这是一种更为严重的疾病。

找到带绦虫组织内显著性的钙质小体,通常支持诊断绦虫幼虫感染;特殊的检测方法通常需要依靠专业的人员来进行操作。

(十一)鼻咽和窦道

在鼻咽和窦道中寄居的寄生虫包括微孢子虫、棘阿米巴属和耐格里原虫属。检测所需的样本包括碎屑、穿刺液和(或)活检标本。染色方法包括改良三色染色、抗酸染色和组织革兰染色。吉姆萨染色、荧光增白剂和常规三色染色也常被使用。如怀疑耐格里原虫属或棘阿米巴属感染,建议使用培养法。在某些皮肤利什曼病中,利什曼原虫可在鼻咽部位寄生;对于穿刺液和活检样本,还建议制作一张涂片并采用血液涂片染色法以确诊;培养法也是一种选择[1]。

(十二)直肠组织

通常,当患者有曼氏血吸虫或日本血吸虫的陈旧慢性感染或轻度感染时,不能在粪便中发现虫卵,但在直肠黏膜检查时有可能会找到虫卵。将新鲜的直肠组织用 2 片载玻片进行压片并在低倍镜下进行镜检(低密度光源)[1]。对于这些虫卵的严格检查将表明虫卵内是否仍有活的毛蚴。治疗可能会根据虫卵的活性而实施,鉴于此,应向医生报告虫卵的状态。

(十三)皮肤

利用皮肤切片是检查人类感染盘尾丝虫和链尾曼森线虫的首选诊断方法[1,7]。2 种微丝蚴主要寄生在皮肤,盘尾丝虫的微丝蚴很少在血液中被发现,偶尔出现在尿中。皮肤标本应有足够的厚度,以包括真皮乳头的外侧部分。用拇指和示指将皮肤捏出皱褶,并用手术刀切一小片来取样,或将皮肤用针挑起成“小锥状”取样。采样原应避免大的出血且有液体微微渗出为宜。随着角膜-巩膜穿孔器(Holth 或 Walser 型)研发成功,采用该装置获得的皮肤样本有着均匀的尺寸和深度,平均重量 0.8 mg(范围是 0.4～1.2 mg),该操作过程简单且无痛。在非洲盘尾丝虫病的检查中,皮样常采自臀部(在髂嵴之上);在中美洲盘尾丝虫病检测中,适宜的皮肤取样部位是肩部(在肩胛骨之上)。

皮样取下后应迅速滴加一滴生理盐水或蒸馏水并加盖以防止其干燥;解剖针采样不是必要的步骤,但该操作可促进微丝蚴的释放。微丝蚴在生理盐水中的出现更为迅速;然而在任何一种溶液中,微丝蚴通常在 30 min 至 1 h 内出现,并且可以采用低强度光显微镜的 10× 物镜检查。为了观察微丝蚴的形态细节,要先将样本晾干,用无水甲醇固定,并采用吉姆萨染色或血片染色。

皮肤活检样本用来检测皮肤阿米巴病(溶组织阿米巴或棘阿米巴属),皮肤利什曼原虫的检测应采用组织切片取样,并用苏木素染色-伊红染色法[21]。

尽管血吸虫病不表现出皮肤症状,但是该病的唯一表现就是皮肤损害。基于皮肤活检的常规组织学检查,虫卵可在细胞浸润的病灶中发现。

当评估患者不常见的皮肤损伤时,完整的病史可以揭示血吸虫病在流行区的传播。

含有利什曼原虫的样本可通过穿刺取得,穿刺过程需穿过溃疡取得未感染的皮肤,而并不是在溃疡表面取材。在取样前,必须彻底清洁溃疡表面;任何带有细菌或真菌的污染样本可能会阻碍虫体的培养。穿刺物涂于载玻片上并用吉姆萨染色或血涂片染色法染色。

有些人喜欢通过病灶的活动边缘来钻取活组织检查(清洗患处后),从溃疡底部真皮刮样可取得良好的检测结果。当对溃疡底部和活动边缘的真皮刮样检测联合使用时,检测的敏感性增加到94%[23]。穿刺培养是检测患者慢性溃疡最敏感的方法。然而,一次成功的培养依赖于没有细菌和(或)真菌的污染;溃疡样本必须正确处理以防止产生假阴性的培养结果。

六、血液

鉴于生活史的特征,许多寄生虫可通过血液中采集,可以是全血或血沉棕黄层或浓集样本。这些寄生虫包括疟原虫、巴贝虫、锥虫、杜氏利什曼原虫和微丝蚴。尽管很多寄生虫在新鲜的全血中是有活性的,但虫种的鉴定常通过薄血膜和厚血膜的永久染色涂片完成。血膜要用无抗凝剂的新鲜全血制备抗凝血(建议使用 EDTA;也可以采用肝素,但对原虫的形态学鉴定不是很好;其他抗凝剂不推荐使用)或者各种浓缩过程中产生的沉淀物来制备。尽管吉姆萨染色已作为首选染色方法使用了多年,但寄生虫在瑞氏染色的血片中,瑞氏/吉姆萨联合染色或更快的染色方法,如 Diff-Quik(American Scientific Products, McGaw-Park, IL), Wright's Dip Stat 染色(Medical Chemical Corp., Torrance, CA)或 Field 染色中也是可见的。在具体环境下,可依据个人对操作的熟悉程度来选择适合的染色方法,而不一定都要使用瑞氏染色这一比较复杂的方法。中性粒细胞是任何血片染色方法中的质控细胞。无论使用何种染色方法,寄生虫的染色就像中性粒细胞的胞核及胞质。Delafield 苏木素染色通常用于微丝蚴鞘的染色;在某些病例中,吉姆萨染色不能为微孢子虫的区分提供足够的染色条件(表 138-12)。在处理血样和其他临床样本时,应按照标准的防护措施来进行操作[1,4-5,15,24]。

(一)厚血膜和薄血膜的制作

可在新鲜血液中鉴定微丝蚴和锥虫的形态和活力,但是特殊的鉴定需要进行永久性的染色。建议制作两种类型的血涂片。厚血膜血量多,可增加轻度感染的检出率[1,5,13]。然而只有有经验的技术人员能进行厚血膜的原虫鉴定。尤其是在疟疾病例中,血液原虫的形态学特征最好在薄血膜中观察。

表 138-12 血液原虫的回收和鉴定技术(EDTA 或肝素)[a][25-29]

寄生虫	方法	染色
疟原虫	厚血膜和薄血膜	吉姆萨染色、瑞氏染色、Field 染色、快速染色
	QBC[b]	染色不相关(离心、吖啶橙、镜检)
	SD BIOLINE[c]	染色不相关(HRP-2 免疫层析法)
	Binax Now Malaria[d]	染色不相关(HRP-2 和醛缩酶免疫法)
	PATH IC Falciparum malaria IC[e]	染色不相关(HRP-2 免疫层析法)
	Malaria Ag-CELISA[f]	染色不相关(HRP-2 免疫层析法)
	RapimalDipstick[f]	染色不相关(HRP-2 免疫层析法)
	RapimalCassette[f]	染色不相关(HRP-2 免疫层析法)
	OptiMAL[g]	染色不相关(pLDH 免疫层析法)
巴贝虫属	厚血膜和薄血膜	吉姆萨染色、瑞氏染色、Field 染色、快速染色

（续　表）

物种	方法	染色
微丝蚴	厚血膜和薄血膜，Knott 浓集，膜滤过，梯度离心	吉姆萨染色，瑞氏染色或 Delafield 苏木素染色
	QBC[b]	染色不相关
	Binax Now ICT Filariasis[d]	快速试纸条
	Filariasis Ag-CELISA[f]	酶免疫法（EIA）
	TropBio[h]	快速试纸条
锥虫	厚血膜和薄血膜，血沉棕黄层涂片，三重离心，培养	吉姆萨染色、瑞氏染色、Field 染色、快速染色
	QBC[b]	染色不相关
利什曼原虫	厚血膜和薄血膜，血沉棕黄层涂片，培养	吉姆萨染色、瑞氏染色、Field 染色、快速染色

注：[a] 分子技术仍处于实验阶段，且并不总是可用的；如在美国境内使用，请确保该产品已通过美国 FDA 批准（可与生产厂商联系）。如果在美国境外使用，有很多其他可用于疟疾检测的基于免疫方法的商品化试剂盒；许多产品都在列表中被列出。贴有有效 CE 标示的产品代表该产品符合相关的欧洲新方法产品安全指令。该指令规定了欧盟市场销售的产品必须满足的基本要求。自 2017 年 12 月 31 日起，WHO 预审部门将决定疟疾快速诊断试剂的采买资格（http://www.who.int/malaria/news/2016/rdt-procurement-criteria/en/）（访问时间：2017 年 9 月 14 日）。[b] QBC 血液寄生虫检测方法（Becton Dickinson 热带病诊断，Sparks，MD）。[c] 恶性疟原虫 SD BIOLINE 快速检测（Standard Diagnostics. Inc./BIOLINE/Alere，Waltham，MA）（CE 认证）。这个试验在美国并未获得检测的许可。该试验是以试纸条形式进行的。[d] Binax Now Malaria（4 种疟原虫）（Alere，Inc.，Waltham，MA）FDA 批准，Binax Now ICT Filariasis（班氏吴策丝虫）（Binax，Inc.，Portland，ME）（在美国和欧盟均未上市）。该试验是以试纸条形式进行的，并且均有阳性对照。[e] PATH IC Falciparummalaria IC test（PATH，Seattle，WA）。该试验是以试纸条形式进行的。[f] FilariasisAg-CELISA（班氏吴策线虫），MalariaAg-CELISA（恶性疟原虫）。RapimalDipstick（恶性疟原虫），RapimalCassette（恶性疟原虫）（Cellabs，悉尼，新南威尔士，澳大利亚）。[g] OptiMAL（区分恶性疟原虫和卵形疟原虫）（Flow，Inc.，波特兰，OR）。该试验是以试纸条形式进行的。[h] TropBio（詹姆斯·库克大学，昆士兰汤斯维尔，澳大利亚）

对厚血膜和薄血膜的精确检查和寄生虫物种的鉴定需要采用完全清洁、无油脂的载玻片进行涂片。旧的（无划痕）的载玻片要先用去污剂进行一次清洁，然后再浸泡于 70％乙醇中；新的玻片也需清洁后浸泡于乙醇中（用纱布而非棉花），并在使用前将其晾干。

厚血膜和薄血膜应在 STAT 方式下处理（订制、收集、处理、检查、报告）。当患者进入或出现在急诊室时需要准备血涂片，这是由于临床病例常缺乏典型的发热，患者也没有被怀疑感染疟疾。如果疑似疟疾仍然需要进一步诊断，第一组阴性涂片后，应间隔 6 h 或 8 h 取样，且取样至少要连续进行 3 天。通常情况下，在 1～2 天后，没有其他血液样本被送至检测要怀疑其他病原体感染。另一种选择是在入院时立即采集血液，如果最初的血片是阴性的，需连续 2 天每天采集标本（如果间隔发作存在，但是疟疾发病并不是总表现出周期性）。无论使用任何一种血样采集方式，患者治疗实际上取决于医生和实验室工作人员要了解一个阴性的血膜并不意味着可以排除疟原虫感染的可能性。

指尖采血后，血液应能够自由流动；血液像挤奶样被挤出并混有组织液，这将使寄生虫的密度降低。另一可选方法是在指尖血中加入抗凝剂（首选 EDTA），以便血涂片的制作。理想情况下，涂片需在样本采集后 1 h 内制备。如果时间过于延迟，点彩在染色的血膜上不可见，而且随着时间的延长，其中的原虫形态越容易发生改变；然而染色后 1～2 h 内血膜上的生物体形态都是可以接受正常观察的，4～6 h 后寄生虫将会丢失。

取样时间应在采血管上和检测报告中标注清楚。医生将根据患者的症状来判断结果。在反馈给医生的报告中也应该标注，一个阴性样本并不能排除寄生虫感染的可能性。

1. 厚血膜　制作厚血膜涂片要将 2～3 滴指尖血（非抗凝）直接涂于酒精清洁的载玻片上。用玻片的一角打圈混匀样本，使其形成一个直径 2 cm 的圆形。继续搅拌 30 s，以防止染色后纤维蛋白丝可能掩盖寄生虫。如果血样中加有抗凝剂，直接将其推成一个直径 2 cm 的圆形，且无须再搅拌 30 s，因为抗凝血不会形成纤维蛋白丝。

如果血样太多或玻片上有油污，在染色时血样可能会脱落。血膜需在无尘干燥处（室温）制作。不要加热厚血膜，由于加热会使血液固定，从而导致红细胞在制片时仍保持完好；结果是染色滞留，进而导致不能正确地鉴定寄生虫的形态。

但厚血膜可在 37℃下孵育 10～15 min 以便其干燥，该方法效果良好。需牢记的是，血膜不能太厚，以透过血膜可以看到报纸上的字迹为宜。在厚血膜充分干燥以后，通过沉淀而除去血红蛋白。沉淀玻片需将其在染色前 10 min 置于缓冲液中或稀释的吉姆萨染色液中。如厚血膜不能被及时染色，在储存前要将其沉淀[1]。尽管上述方法不经常使用，但是厚/薄血膜联合使用的方法也是可以采用的[1,6-7]。

2. 薄血膜 虽然与厚血膜相比，薄血膜每个面积上含有的微生物数量大大减少，但薄血膜是寄生虫鉴定的常用方法。薄血膜的制作需要的血量与厚血膜不同，一片制作良好的薄血膜呈现一端厚一端薄(红细胞均匀分布而没有重叠)。薄的羽翼状末端至少需要 2 cm 长，血膜应在玻片的中间，两边需留有空隙。涂片中的小洞表明玻片上有油污。在涂片空气干燥后(不要加热)进行染色。根据选择的染色方法决定染色前血片是否需要进行固定。

(二)血膜染色

为了准确鉴定血液寄生虫，实验室应当熟练制定且至少使用一种良好的染色法[1,6-12]。由于血膜需要长时间储存，可能造成染色滞留，血膜应在制作当天染色或采样几天内染色。如果没有制作厚血膜，可能需要制作一个薄血膜以代替厚血膜进行染色，并检查薄血膜的厚端。在染色过程中，红细胞被沉降，白细胞、血小板和寄生虫则被留下。

瑞氏染色是染色液与固定剂联合使用的方法，固定和染色可在同一时间完成。厚血膜必须在染色之前进行沉淀。在水溶吉姆萨染色液中，固定和染色是分开的。因此薄血膜需要在染色前采用无水甲醇固定。

当载玻片从任何一种类型的染色溶液中拿出时，应该垂直晾干。在空气中干燥后，可在血片上直接滴加镜油来进行油镜检查。如果载玻片要进行长时间的储存以备教学或法律用途，应加盖盖玻片并浸入如中性树胶的介质中来保存。任何进行 Romanowsky-Giemsa(RGS)染色的血涂片和置于 Permount 或其他树脂介质中的涂片都容易发生嗜碱性物质的褪色和染色强度的损失。抗氧化剂，如 1%(以体积计算)2,6-二叔丁基对甲酚(丁基化羟基甲苯；Sigma-Aldrich 公司)，可以添加到浸泡介质中。如不添加抗氧化剂，血片的染色最终会呈现粉红色；用这种抗氧化剂保存的染色片经过多年都不会变色。

1. 吉姆萨染色(Giemsa stain) 对于每一批新的吉姆萨染色试剂在用于患者样本检测前都应进行染色时间的优化。如果血细胞能够被充分染色，则该染色时间和染色剂的稀释度就适合疟原虫和其他寄生虫的染色鉴定。使用液态染色剂或用粉剂配制可依据个人的喜好，这两种配制方法没有明显的不同。

商业化的液态染色剂或干粉配制好后可储存，在配制成工作浓度时，两者的稀释度大致相同[1,5]。储存吉姆萨染液在给厚血膜和薄血膜染色前需用缓冲液进行 1∶10 的稀释，稀释范围为 1∶10 到 1∶50。染色时间通常根据染色液的浓度来确定(例如，1∶20 稀释需要 20 min 或 1∶50 稀释需要 50 min)。有些人喜欢用较长的染色时间和较低浓度的染色剂来进行厚血膜和薄血膜的染色。用来稀释储存染液的磷酸盐缓冲液应当是中性或偏碱性的(pH 7.0～7.2)。磷酸盐缓冲液使用时需要有正确的 pH。在某些实验室，自来水的 pH 就可满足染色要求，并可用于整个染色过程和最后的冲洗步骤中。

吉姆萨染色中的血细胞颜色如下：红细胞呈淡红色；白细胞的细胞核为紫色，细胞质为浅紫色；嗜酸性颗粒，鲜艳的紫红色；中性颗粒为深粉红色和紫色。在疟原虫中，胞浆染成蓝色，细胞核染成红色或紫红色。Schüffner 点和红细胞中其他包涵体被染成红色，但可以变化。其他血液原虫，如巴贝斯虫、锥虫和利什曼原虫，它们的细胞核和细胞质的染色特征与疟原虫相似。然而，微丝蚴的外膜不能被吉姆萨染色法染色，其细胞核被染成蓝色至紫色。

2. 瑞氏染色(Wright's stain) 瑞氏染色的试剂有液体形式和粉末形式，粉末在使用前必须溶解在无水丙酮-无水甲醇中。由于瑞氏染色剂中包含乙醇，薄血膜在染色前不需要进行固定。厚血膜的瑞氏染色效果通常不如吉姆萨染色效果好。需格外注意的是，在最后的冲洗时要避免玻片上有过多的染色剂沉淀。在染色前，厚血膜需浸于蒸馏水中(使红细胞破裂并除去)，再在空气中晾干。染色过程与薄血膜相同，但染色时间需

要延长以使得涂片的每个部分都被染色。瑞氏染色中血细胞的颜色如下：红细胞呈浅褐色、红色或浅黄色；白细胞的细胞核呈明亮的蓝色而胞质呈浅蓝色；嗜酸性颗粒呈亮红色；中性颗粒为粉红色或浅紫色。

在疟原虫中，细胞质被染成淡蓝色，细胞核染成红色。Schüffner 点和红细胞中其他包涵体在瑞氏染色中通常不被染色或染色较浅。其他血原虫，如巴贝斯虫、锥虫和利氏曼原虫，它们的细胞核和细胞质的染色与疟原虫相似。然而微丝蚴的外膜不能被瑞氏染色法染色，其细胞核被染成淡蓝色至深蓝色。

3. 血片的其他染色方法　吉姆萨和瑞氏染色是很好的染色方法，对于寄生虫也可采用瑞氏/吉姆萨联合染色法来进行检测，或使用更为快捷的染色法如 Diff-Quik（American Scientific Products），Wright's Dip Stat 染色（Medical Chemical Corp.）或 Field 染色。中性粒细胞作为任何染色血片的质控细胞。无论使用何种染液，血液原虫的染色与中性粒细胞相似。需要牢记的是，使用任何一种血片染色方法，染色后颜色的改变都是常见的现象。

4. 埃博拉病毒的失活　疾病预防控制中心建议，除了执行强化的安全程序如使用个人防护设备和经认证的二级生物安全柜外，在检测疑似感染埃博拉病毒患者的样本之前，应该添加 Triton X-100，并在 56℃下进行热灭活。经过上述灭活程序处理后的标本，并不影响利用 BinaxNOW 快速诊断实验和实时 PCR 检测恶性疟原虫的实验结果。这种灭活程序提高了实验室工作人员处理疑似含有埃博拉病毒标本的安全性，同时又不影响疟疾诊断实验的有效性（http://www.cdc.gov/vhf/ebola/hcp/interim-gilidance-specimen-collection-submission-patients-suspected-infection-ebola.html；2017 年 8 月 3 日访问）。对于薄血膜，15 min 的无水甲醇固定可灭活埃博拉病毒。因此，无须预先对血液样本进行灭活处理。

（三）薄血膜和厚血膜检查

在未确诊的疟疾病例中，应该采用低倍镜进行薄血膜的初筛，因为如不进行整个薄血膜的检查，微丝蚴就可能被漏诊。微丝蚴很少大量存在，且经常在薄血膜中只有零星几个。可在薄血膜的边缘或涂片的羽翼状末端找到微丝蚴，因为它们在血液的扩散使其容易聚集在上述部位。薄血膜检查法在疑似微生物没有被证实的情况下非常有用。在羽翼状的涂片末端，红细胞被拖长呈单个分散，检查疟原虫和锥虫的存在应在独特的细胞层中进行。在这个区域，感染红细胞的形态和大小最为明显。

在疑似疟原虫感染的病例诊断中，需要依据 STAT 操作法进行血涂片的检查，所有的检查报告（阴性和阳性）要尽快通过电话告知医生[1,5]。薄血膜的检查应在放大倍数为×1000 的油镜下观察 200～300 个视野。尽管有人采用×50 或×60 的油镜观察来筛选薄血膜，疟原虫、巴贝斯虫属或杜氏利什曼原虫有可能会在放大倍数太小时被漏诊（×500 或×600），它们通常在总放大倍数为×1000 和×100 的油镜检查中被观察到。因为镜检者检查血片的效率不同，在最小的范围内进行检查是很重要的，不管检查需要多少时间来完成。如果在厚血膜涂片中发现疑似微生物，薄血膜检查的视野应在 300 个以上。

已有关于利用自动检测仪对血液原虫进行诊断所出现问题的报道[1]。疟原虫和巴贝斯虫的感染在使用这种仪器时会被漏检，治疗也因此而延迟。由于这种仪器不能够用来检测细胞内的原虫，任何依赖自动化检测系统来区分未感染的红细胞和感染寄生虫的红细胞可能会给诊断带来严重的问题。

在厚血膜的制备中，血细胞的最高浓度聚集在血涂片的中央。在每个厚片的寄生虫检查中应最初用低倍镜（×10 的物镜）镜检以检查微丝蚴。厚血膜的检查通常需要 3～5 min（约 100 个油浸视野）。疟原虫和锥虫的检查最好在油镜下进行（总放大倍数为×1000）。厚片的最边缘处检查可展示完整的红细胞；这些细胞如被感染，则可能为疟疾的检测提供有用的信息，因为使得通过必要的形态学特征将生物体鉴定到种的水平更为容易。

（四）疟原虫的免疫层析检测法

免疫层析依赖液体在硝酸纤维素膜表面上的迁移来工作。以疟原虫抗原为靶标制备的单克隆抗体点于硝酸纤维素膜上，检测依赖从外周血捕获疟原虫的抗原来进行。目前用于此种

快速检测的疟原虫抗原包括组氨酸蛋白2(HRP-2),虫体乳酸脱氢酶(pLDH)和疟原虫醛缩酶(表138-12)。这种试纸条能为疟疾的诊断提供更快速、不需镜检的方法。这些检查容易操作并进行结果判读,然而,这种类型的检测仍存在一些问题,尤其是FDA认可的Binax Now Malaria Test(Aleve. Inc.,Wa(tham,MA)。阳性对照也包含其内。

敏感性也是一个问题,特别是在无免疫的人群中,疟原虫密度>100个虫体/μl(0.002%虫血症)时应进行血涂片检查和恶性疟原虫的试纸条筛查。但是,当捕获HRP-2或pLDH时,敏感性是所有检测方法中最差的。该敏感性可能和非专业化实验室中临床工作人员采用镜检法诊断的结果差不多,这与他们较少接触疟疾有关。使用试纸条的一个潜在好处是对于没有经验的夜班工作人员来说,试纸条诊断可防止对恶性疟虫血症的漏诊。然而,阴性的检测结果也会受到质疑,还需要厚血膜和薄血膜的镜检来确认试纸条检测限以下的虫血症。同时,风湿病患者的血检可能存在疟疾感染的假阳性。上述情况已在试纸条包装说明和临床患者应用中被验证。美国军方已进行了美国FDA对试纸条的认证实验,因为该检测方法可被用于野外。

(五)浓集法

1. 血沉棕黄层 杜氏利什曼原虫、锥虫及荚膜组织胞浆菌(*Histoplasma capsulatum*)(与杜氏利什曼原虫相似的胞内真菌)可能偶尔在外周血液中被检测到。这些寄生虫或者真菌可在大单核细胞聚集的血沉棕黄层(抗凝全血离心分离出的一层白细胞)中被发现。细胞核被染成深紫红色,细胞浆呈浅蓝色(杜氏利什曼原虫)。组织胞浆菌看起来有些像核物质(深紫红色)环绕的一个空泡区的一个点,而杜氏利什曼原虫生物体中包含一个动基体。外周血中的锥虫也能通过离心集中在血沉棕黄层。

血涂片的制作需要使用酒精清洁的玻片,也可使用微量血细胞比容管,这种管子有精确的刻度并在血沉棕黄层形成界面,白细胞可被制备成薄膜。在血沉棕黄层被移除之前,可对管子进行高倍镜或低倍镜镜检。如果有锥虫存在,在血沉棕黄层能观察到其活动,微丝蚴的活动也是可见的。

2. QBC微量血细胞比容浓集法(QBC micro-hematocrit centrifugation method) 微量血细胞比容浓集法采用QBC疟原虫管,该装置包括玻璃毛细管和紧密配合的塑料插入件(QBC malaria blood tubes; Becton Dickinson Tropical Disease-Diagnostics, Sparks, MD),已被用于血液寄生虫的检测[1]。在浓集物底端的50~60 μl毛细管或静脉血中(QBC离心5 min,14 387×g),寄生虫或包含寄生虫的白细胞沉积在靠近红细胞层顶部1~2 mm的区域内,并通过塑料浮漂贴近管壁,因此容易进行显微镜镜检。管内预涂了吖啶橙,从而对寄生虫进行了荧光染色。该方法自动在液面和管壁间形成了一个浓集涂层,一旦管子被置于塑料支架,油层就会进入血细胞比容管的顶部(不需要盖玻片),就可以对管子进行40~60倍油镜镜检(工作距离为0.3 mm甚至更大)。

尽管疟原虫感染可通过该方法检测(这种方法比厚血膜和薄血膜法更敏感),适当的厚血膜和薄血膜在确定感染虫种的准确鉴定中仍是必须的。

3. 梯度离心(knott concentration) 梯度离心法(concentration procedures)主要用于血液中微丝蚴的检查,尤其是存在疑似轻度感染时[1,6-11]。该方法的缺点是微丝蚴可能会被福尔马林杀死,因此,不能观察到活动的生体。一种替代法是采用柠檬酸皂苷血液浓集法,在该方法中可观察到活动的微丝蚴,直到被稀醋酸染色杀死,虫体在其中仍保持伸直状态,这将为鉴定提供标志[25]。

4. 膜滤过技术(membrane filtration technique) 膜滤过技术在微丝蚴密度很低的丝虫感染鉴定中非常有效。由于曼森线虫的微丝蚴太小,这种鉴定方法的效果并不令人满意。孔径为3 μm的滤膜可以回收该寄生虫。其他孔径的滤过膜没有微孔滤过膜的效果好[1]。

5. Delafield苏木素染色(Delafield's Hematoxylin) 有些来自浓集沉淀的待检样本可制备成干的厚血膜和薄血膜,之后进行Delafield苏木素染色,该方法能更好地展示细胞核的细微结构和微丝蚴的外鞘。除此之外,包含微丝蚴的血涂片也可采用这种苏木素染色法[1]。

6. 锥虫的三色染色-浓集检测法 三色染色-浓集检测法在外周血中锥虫较少的轻度虫血症检

测中有很大用处[1]。将上清液反复离心沉淀后，采用湿涂片法或薄血膜染色涂片法进行检查。

七、总结

本章包含了目前寄生虫感染诊断所需的诊断方法和步骤。如果对临床样本根据样本接受和拒检标准来操作，准备湿涂片、浓集标本、永久染色涂膜、血膜，以及各种培养基，这些都将为寄生虫的鉴定和疑似病原体的鉴定提供详细的信息[1,2,4,6-14,21,26]。尽管其他检测，如免疫诊断试剂盒已成为商业化产品，医学寄生虫诊断的主要工作仍旧依靠微生物工作者的专业知识和显微镜来进行。分子检测方法的不断改进和发展将为人类寄生虫感染的检测提供更敏感、更特异的方法。

参考文献请扫二维码查阅

第139章　疟原虫和巴贝虫

BOBBI S. PRITT

（孙恩华　译；曹建平　审校）

疟原虫（*Plasmodium*）和巴贝虫（*Babesia*）是红细胞内寄生原虫，分别引起疟疾和巴贝虫病，均通过感染的节肢动物（arthropod）叮咬传播，在全球范围造成较高的发病率和死亡率（morbidity and mortality）。尽管两者在流行病学和生活史方面不尽相同，但临床表现和诊断方法有诸多相似之处，因此，把两者放在同一章讨论。

一、分类

疟原虫和巴贝虫均属于SAR亚群，囊泡虫进化枝中的顶复动物门寄生虫[1]。顶复动物门（Apicomplexa Clade），旧称孢子虫，是一大类真核单细胞寄生虫，具有特征性的顶端复合体（利于侵入宿主细胞）和顶质体[2]。顶质体是从红藻与其叶绿体的二次内共生而来，与叶绿体前体不同，其不能进行光合作用而参与合成亚铁血红素、脂类和类异戊二烯[2]。疟原虫属于血孢子虫目（Haemosporida）（SAR：囊泡虫：顶复动物门：孢子虫纲：血孢子虫目：疟原虫），巴贝虫属于梨形目（SAR：囊泡虫：顶复动物门：孢子虫纲：梨形目：巴贝虫）。具体的分类学信息见第135章。

二、疟原虫

（一）概述

疟原虫属的成员经吸血的双翅目昆虫广泛感染鸟类、哺乳动物、爬行动物和两栖类动物[3]。尽管其种类不少于200种，但仅有4种能感染人，分别是：恶性疟原虫（*P. falciparum*）、间日疟原虫（*P. vivax*）、三日疟原虫（*P. malariae*）和卵形疟原虫（*P. ovale*）[4]。虫种鉴定基于形态学特征，而卵形疟原虫由于在形态上与间日疟原虫极为相似，是最后定的种[5]。最近应用多位点分子标记技术鉴别卵形疟原虫的多态性，进一步将该虫种区分为经典株与变异株[6]。目前，普遍认为卵形疟原虫由2种密切相关的虫株组成，在同一地理区域共存而未发生杂交，分别为经典株 *Plasmodium ovale curtisi* 和变异株 *Plasmodium ovale wallikeri*[7]。虽然2个虫株在形态上难以区分，但是其潜伏期不同[8]。

灵长类疟原虫偶可感染人类[9]。2004年，诺氏疟原虫（*Plasmodium knowlesi*）被认为是能感染人的疟原虫[10]，在马来西亚婆罗洲医院的一份调查中发现，27.7%的疟疾病例感染了这种疟原虫[11]。诺氏疟原虫主要感染短尾猿，目前认为它可在东南亚部分地区感染人类[12]。芬兰、瑞典、奥地利、西班牙、英国和美国等地前往东南亚的旅行者中也常有感染病例报道[13]。食蟹猴疟原虫（*Plasmodium cynomolgi*）在东南亚地区偶可感染人类，较为罕见[9]。

（二）流行病学和传播

疟疾是全球最重要的传染病之一，有接近一半世界人口受到威胁[4]。根据世界卫生组织（WHO）报道，2010－2015年，全球疟疾发病率和死亡率分别下降21%和29%，极大提高了疟疾流行地区的平均寿命[4]。但在2015年仍估计有2.12亿新发病例和429 000例患者死亡[4]。其中近92%死亡病例发生在撒哈拉沙漠以南的非洲，该地区的疟疾死亡情况与贫困密切相关。其中70%的死亡病例是5岁以下的儿童[4]。

目前，疟疾主要分布在热带和亚热带地区（表139-1），但也曾广泛分布于包括欧洲和北美[14]在内的许多温带地区。疟原虫主要通过受感染的按

蚊(*Anopheles mosquito*)叮咬传播(图 139-1),这类蚊媒呈世界性分布。疟疾流行国家名单可以在美国疾病预防控制中心(CDC)黄页上找到[15]。当前,美国和欧洲的疟疾病例绝大部分是由于到疟疾流行区国家旅行后输入的,偶有本地病例报告[16-19]。在美国,绝大部分输入性疟疾病例来自那些到流行国家走亲访友的人[20],而他们并未意识到自己正处于疟疾感染风险中,也未寻求旅行保健咨询或采取疟疾预防服药[21]。同时,他们的某些旅行方式,如到偏僻地区旅行和延长旅行时间,也增加了疟疾感染的风险[21]。2014 年,美国疾病预防控制中心共报道 1724 例疟疾病例,其中 5 例死亡[20],这个数据与 2013 年统计的 1741 例疟疾病例相似[20]。在疟疾患者中,走亲访友患者占大部分比例(44.9%),其次分别为难民/移民(8.5%)、商人(6.6%)、传教士及其家属(6.0%)、学生/教师(3.9%)和观光者(3.7%)[20]。在已知病原体的感染病例中,66.1%的病例由恶性疟原虫引起,其次为间日疟原虫(13.3%)、卵形疟原虫(5.2%)、三日疟原虫(2.7%)。不到 1%的病例是由 2 种疟原虫感染引起[20]。

表 139-1 疟原虫感染特征(characteristics of infections)[a]

诊断标准	恶性疟原虫	三日疟原虫	间日疟原虫	卵形疟原虫	诺氏疟原虫
潜伏期(日)	8~11	18~40	10~17	10~17	9~12[b]
发热周期	36~48 h,恶性,隔日或每日发作	72 h,良性,每 3 日发作	44~48 h,良性,隔日发作	48 h,隔日发作	24 h,每日发作
感染红细胞时期	所有时期	成熟细胞	未成熟细胞	未成熟细胞	所有时期
可能的寄生虫血症程度	高	低,<2%	低,<2%	低,<2%	高
感染红细胞黏附	是	否	否	否	可能[b]
疾病严重程度	中度至重度,可致命	轻度至中度	中度至重度,偶尔致命	轻度	中度至重度,可致命
贫血程度	严重	轻度至中度	中度至重度	轻度	严重
中枢神经系统损害	常见	少	偶尔	少	常见
肾病综合征	少	常见	偶尔	少	少
宿主炎症反应程度	高	低	非常高	低	高
复发	否	否,但 50 年内可再燃	是	是	不太可能[b]
流行病区	范围广;热带和亚热带,尤其是非洲和亚洲	范围小;热带	范围广;热带、亚热带和温带;西非相对稀少	热带;撒哈拉沙漠以南地区和东南亚	范围小;东南亚
在流行区的感染比例	80%~90%	0.5%~3.0%	50%~80%	5%~8%	1%~60%

注:[a] 引自参考文献[13][23]和[36];[b] 因病例报告数量有效导致缺少相关信息

另外,还有一些不常见的疟疾传播途径,如输血传播和经胎盘传播。这些传播途径是罕见的,美国 CDC 于 2014 年检测发现 1 例先天性疟疾病例,未发现输血传播病例[20]。在大部分非疟疾流行区国家,仅部分献血者在献血时要申明近期是否到过疟疾流行区或患过疟疾(如果是,则推迟献血),通过这样的问卷筛选在一定程度上保障血液供应的安全。美国血库协会建议到过疟疾流行区的人群在离开流行区 1 年后再献血,有疟疾病史和在流行区居住超过 5 年的个体应该在成功治愈 3 年后再献血[22]。有些欧洲国家和澳大利亚采用抗原检测方法筛查可能接触疟疾的个体,从而缩短延缓的时间。相比之下,美国 FDA 还没有认证或批准用于献血者血液疟原虫筛查的检测方法[22]。

(三)临床表现

疟疾(malaria)患者在起初 7~30 天潜伏期内无临床症状,疟原虫在这期间主要是在肝内增殖[23]。只有当宿主红细胞后续感染并被破坏后,葡糖糖磷酸异构酶等疟原虫抗原释放入血,刺激细胞因子产生,从而导致发热。典型疟疾发作开

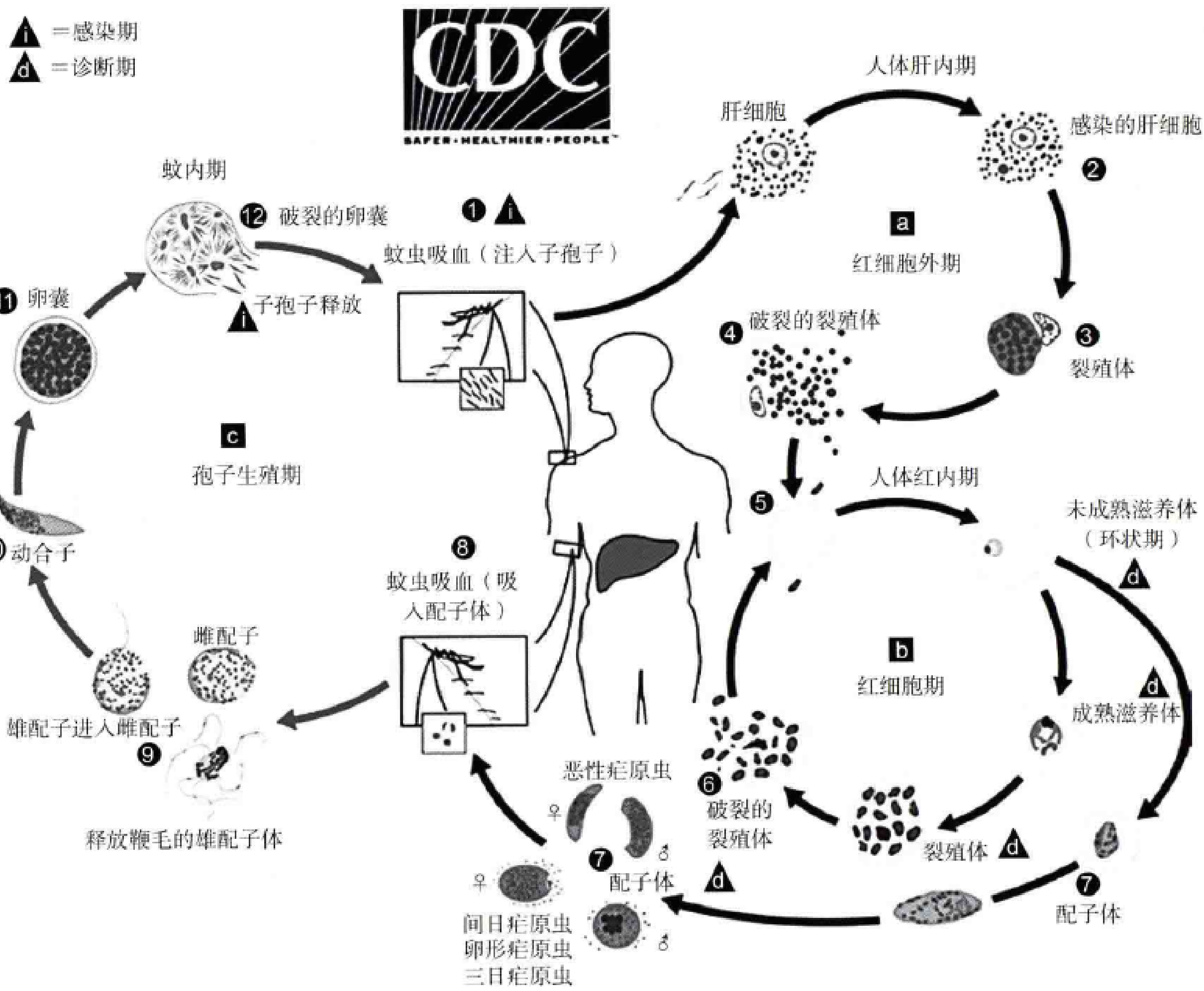


图 139-1 疟原虫通过雌性按蚊吸食人血时向人体血循环中注入子孢子(sporozoites)而传播①。子孢子感染肝细胞②，并通过无性增殖形成裂殖体③，这个过程称为红细胞外裂体增殖(a)。5～15 日后，肝细胞裂殖体破裂释放成千上万的裂殖子入血④，然后裂殖子感染红细胞⑤。间日疟原虫和卵形疟原虫具有休眠期，可在肝细胞残存，数周至数月后引起复发，而其他疟原虫没有这个期。在红细胞内，裂殖子进行无性增殖形成滋养体，随后变成裂殖体，这个过程称为红细胞内裂体增殖(b)。裂殖体破裂释放裂殖子，感染其他红细胞⑥。这个过程每 1～3 日重复一次，从而在数日内生成许多感染的红细胞。有些裂殖子感染的红细胞不进行无性增殖，而发育成雄性小配子体和雌性大配子体⑦。当蚊虫叮咬吸血时⑧，通过有性生殖的方式，小配子体释放雄配子，穿入雌配子形成合子⑨，这个过程称为孢子发育(c)。合子变成运动且拉长的动合子⑩，能侵入蚊子中肠壁发育成卵囊⑪。经过 8～15 日，卵囊生长、破裂，释放许多子孢子，转移到蚊子的唾液腺⑫，在蚊子再次吸血时接种到新的人体宿主内①。生活史图片由 CDC DPDx 提供(http:// www.cdc.gov/dpdx/)，见彩插

始是寒战，紧接着突然发热，持续 1～2 h。大量出汗后发作缓解，体温可恢复正常。随着时间推移，感染的细胞开始同时破裂，发生典型的(但不易观察到)“间日热”或“三日热”(表 139-1)。发热前或发热时伴随严重的头痛、精神萎靡(malaise)和肌肉酸痛[23]。

疟原虫感染范围可从轻度感染或无症状表现到重度致命，前者通常发生在有免疫力的人群中。重症疟疾死亡率非常高，包括如下一种或多种特征，如无意识昏迷、全身抽搐、呼吸窘迫、休克、异常出血、黄疸、血糖过低、酸中毒、严重贫血、肾衰竭、高乳酸血症和高原虫血症(每微升血多于 100 000 个原虫)[24-25]。其中婴幼儿、无免疫力人群和孕妇及其胎儿是重症疟疾的最高危人群[25]。

恶性疟原虫感染引起的发病率和死亡率是四种人体疟原虫中最高的，几乎造成了全球所有的重症疟疾和疟疾死亡病例[23]。诺氏疟原虫和间日疟原虫也可导致患者死亡，相对前者，后者引发的死亡率较为少见[24]。恶性疟感染的高发病率和死亡率部分原因是恶性疟原虫能感染和破坏所有时

期的红细胞，导致高原虫血症和重度贫血、脾大及黄疸。相比之下，其他疟原虫优先感染成熟红细胞（三日疟原虫）或网织红细胞（间日疟原虫和卵形疟原虫），所致红细胞破坏程度轻[23]。

恶性疟原虫毒力也归因于感染后红细胞粘连现象，即在疟原虫发育后期将恶性疟原虫红细胞膜蛋白1（PfEMP1）家族的虫源性黏附分子运输到感染红细胞表面。PfEMP1分子可以将周围未感染的红细胞通过受体介导感染红细胞与内皮细胞的黏附聚集到感染的红细胞周围（花环形成）[26]。微血管聚集的感染红细胞可导致代谢性酸中毒、缺氧及释放有害的炎性细胞因子，特别是在肺、肾和大脑。妊娠期，一种特殊形式的细胞黏附发生在感染红细胞和胎盘的合胞体滋养层之间[26]。由恶性疟高原虫血症和微血管内红细胞聚集所引起的症状包括急性肾衰竭、呼吸窘迫、流产、宫内生长迟缓、精神状态改变、昏迷和死亡。其他疟原虫虫种通常不出现因感染红细胞黏附造成的严重症状[23]。在高效青蒿素（artemisinin）联合疗法（ACT）出现之前，即使简单的恶性疟原虫感染都可引起0.1%的死亡率，如果延迟治疗或药物耐药可使死亡率升至1%[24]。现在，使用ACT疗法后，非复杂恶性疟疟疾的死亡率低于1%[24]。

其他与虫种相关的临床表现包括脾破裂（间日疟原虫感染）、肾病综合征（儿童三日疟原虫感染）、低血糖（儿童恶性疟原虫感染）、大量的红细胞破坏伴血红蛋白尿和肾衰竭[又称"黑尿热（blackwater fever）"，恶性疟原虫感染]、复发（三日疟原虫感染）和由于休眠子在肝内活化导致的复发（卵形疟原虫和间日疟原虫感染）[23]。也有诺氏疟原虫感染的死亡病例报道。鉴于疟原虫感染可引起不同的症状，包括胃肠道和呼吸道症状，因此对任何近期到过疟疾流行区的发热患者均应考虑疟疾[27-28]。

(四)标本的采集、运输和储存

由于恶性疟原虫感染后发病迅速且致命，所以疟疾患者的血样采集和检测应符合STAT 准则[29-31]。厚和薄血膜镜检是诊断疟疾的金标准。若实验室不具备检查厚和薄血膜的专业技能，应采用快速抗原检测初筛（请见"临床和实验室诊断"部分）或即刻将血样送至邻近具有检测能力的实验室。应该一周7天，每天24 h都能进行疟疾检查[30-31]。

最好采用手指采血并立刻制作厚和薄血膜。而在非流行区常采集静脉血并即刻送实验室[30]，最好采用乙二胺四乙酸（EDTA）抗凝血剂，如用肝素等其他抗凝血剂容易使疟原虫形态变形[30]。但长时间保存在EDTA中也会导致虫体变形，使原虫成熟到有性阶段，从而失去例如点彩（stippling）等诊断的形态学特征；因此，应该在采血后1 h内制作血膜[30,32]。一次厚和薄血膜通常难以检测到疟原虫。临床与实验室标准协会（CLSI）推荐，患者初次应制作2张厚血膜和2张薄血膜，如果有必要的话，从临床鉴别诊断方面考虑，在排除疟疾前3天中每6～8 h重复制作一次厚和薄血膜[30]。同样，CDC建议，对于免疫力缺陷患者，在排除疟疾诊断前，应每隔12～24 h检查血膜涂片，连续3次[27]。

必要时可冷藏EDTA抗凝血进行PCR等补充检测。遗憾的是，贮存血中的原虫形态很快就破坏了，从而不适合用于形态学方法鉴别和确定虫种。在本书的第136章和138章，以及临床与实验室标准协会（CLSI）有关血源性寄生虫诊断指南[30]中详细描述了血标本的采集与血膜制作。要求制作血膜时应提供重要的患者信息，如临床症状与体征、旅行史及预防服药或抗疟药治疗情况，这些因素会抑制寄生虫血症或改变原虫的形态。

(五)临床和实验室诊断

仅凭临床症状不能诊断疟疾，建议采用特异的寄生虫检验方法进行确诊[33]。有很多实验室方法可以诊断疟疾，其中厚和薄血膜法是金标准[27,33]。快速抗原测试被广泛应用，并作为WHO在全世界范围内治疗疟疾的一个必不可少的方法[34]。如果条件允许，可采用分子生物学的方法对病原体进行敏感性和特异性的检测[35]。血清学试验对于急性感染没有意义，但可作为献血员的筛查方法和流行病学调查研究的方法[36]。

(六)直接检查

1. 显微镜检查吉姆萨染色血膜(Giemsa-stained blood films) 显微镜检查吉姆萨染色厚、薄血膜是诊断疟疾的金标准。该方法结果的准确判断依赖于培训有素和经验丰富的镜检员、高质量的试剂及维护良好的光学显微镜。厚血膜含1～2滴血液，加入低渗溶液于玻片上溶血[30]，释放出细胞内原虫，可对20～30层细胞的血膜进行检测。厚血膜比薄血膜敏

感 10～20 倍，检测阈值是 10～50 个原虫/μl，或接近 0.0002%～0.0010%的寄生虫血症，前提是总体红细胞数是 5×10^{12}/L[37]。鉴于其高敏感性，厚血膜很适用于疟原虫筛查和检测。在现场检测时敏感性估计会低一些(100～500 个原虫/μl)[37-38]。

鉴于厚血膜检测比薄血膜具有更高的敏感性，应尽快制作厚血膜作为初筛方法，但问题是血膜太厚，干燥所需的时间更长。制作精良的厚血膜直径 1.5～2.0 cm，其厚度最好是透过血膜隐约可见报纸上的字符[30]。可以将厚血膜置于层流工作台中或放在电扇的微风下加速干燥。但不建议加热，以免引起血液固定，影响红细胞溶解[30]。用另一张玻片的边缘将血滴轻轻涂成合适直径的圆形厚血膜，从而使血液黏附在玻片上，不因干燥时间的延长而影响原虫形态[39]；当血膜明显干燥后再进行染色(一般在 30 min 以内)。

薄血膜制作方法和血液学血膜的制作方法一样。将一滴血在载玻片上推成羽毛缘状，染色前用甲醇固定[30]。

最好用 pH 7.0～7.2 的吉姆萨染液对厚、薄血膜进行染色，能凸显原虫的特殊结构[30](见第 137 章的疟疾染色部分)。也可用 pH 6.8 的瑞氏-吉姆萨染色，但是不能充分展示薛氏小点和 Maurer 裂块。现场染色有助于快速诊断，但不建议在非流行病区常规应用[36]。如怀疑埃博拉病毒等出血热病毒感染，可参考 CDC 网站的标本处理流程(https:cdc.gov/vhf/ebola/health care-us/laboratories/safe-specimen-management.html)。染色后，一个制作精良的厚血膜背景相对干净，有已裂解红细胞、白细胞核和血小板；而薄血膜可见蓝灰色至淡粉红色的红细胞，且血膜边缘成羽毛状。原虫胞质染成由浅至深的蓝色，染色质呈粉红色[30]。

厚和薄血膜首先在 10 倍镜下观察，然后再使用 100 倍油镜进行检查[30]。报告阴性结果前需在 100 倍油镜下查看 200～300 个厚和薄血膜视野[30]。在厚血膜上准确鉴别疟原虫虫体、血小板、染色碎片和白细胞颗粒需要具有大量的实践经验(图 139-2)，可通过加强培训提高敏感性。厚血膜能鉴定虫种，但最好同时检查薄血膜。因为薄血膜在染色前用甲醇固定，保持了红细胞及细胞内虫体的形态，故能提供虫种鉴定需要的典型红细胞和疟原虫形态[30]。检查薄血膜疟原虫形态最佳的位置是红细胞重叠少，且可见明显的中央淡染区的区域(图 139-3)，而其他区域的虫体可能发生明显变形。虫种鉴定需要形态学特征，包括感染的红细胞大小和形状、是否有胞质内容物(如点彩)、外周血中原虫所处的阶段，以及每个阶段的特征结构(表 139-2，图 139-4 至图 139-8)。有关疟原虫虫种鉴定的图册和其他相关资料已经广泛普及[29,36,40-42]。

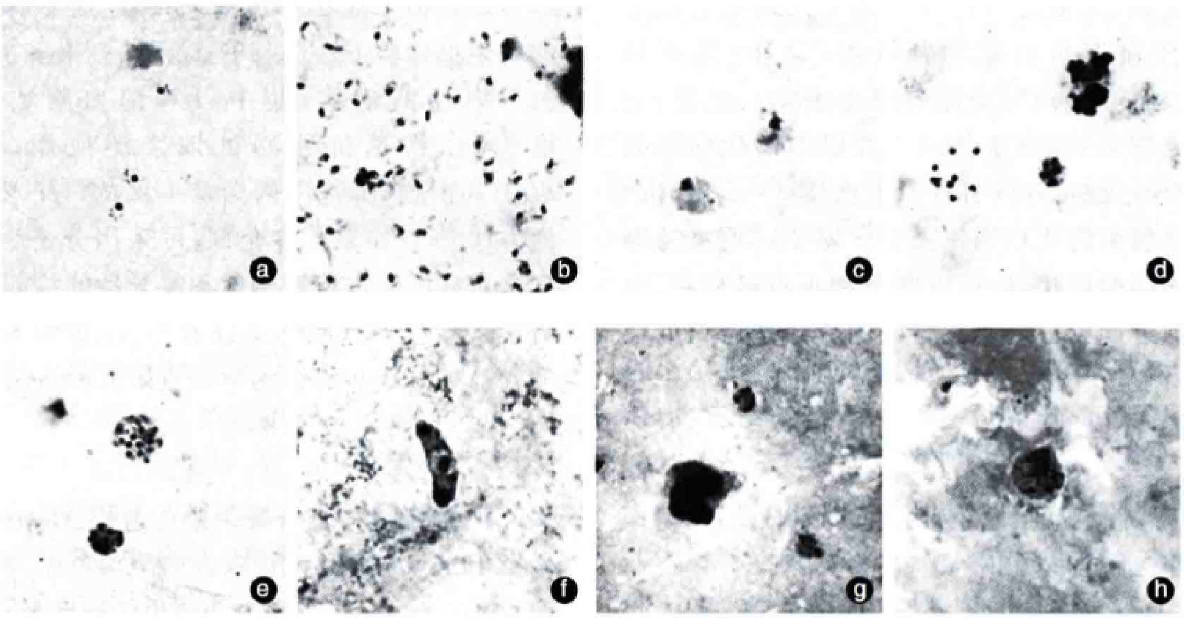


图 139-2　厚血膜中疟原虫的形态包括滋养体、裂殖体和配子体。图中分别是中度(a)和重度(b)间日疟原虫早期滋养体(c)；三日疟原虫(d)和间日疟原虫(e)裂殖体；恶性疟原虫(f)、三日疟原虫(g)和间日疟原虫(h)配子体。其中 d 和 g 比较了中性粒细胞的大小(吉姆萨染色，1000×)，见彩插

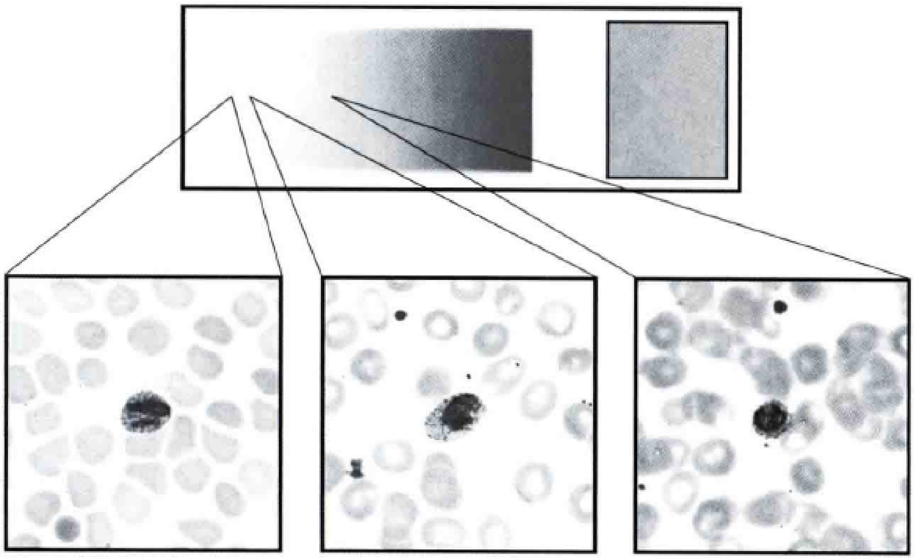


图 139-3 薄血膜理想的显微镜检测视野是薄缘区域，这些区域的红细胞重叠最少，并保证其中心染色浅（中间）。薄缘区感染卵形疟原虫的红细胞明显涨大并呈卵圆形。而当在太薄（左侧）或太厚（右侧）区域查看相似的细胞时，常因细胞形态扭曲而误判，见彩插

表 139-2 薄血膜吉姆萨染色的不同疟原虫形态学比较[a]

诊断标准	恶性疟原虫	三日疟原虫[b]	间日疟原虫	卵形疟原虫	诺氏疟原虫
感染红细胞大小和形状	大小和形状正常	大小正常或略微缩小，形状正常	大小正常或涨大	大小正常或涨大，通常是卵圆形，可能有毛刷状边缘	大小和形状正常
胞质内容物	偶见茂氏点，呈逗点状，比薛氏点大，但是数量要少	少见齐氏点；需有特意的过度染色	薛氏点；在早期滋养体可能没有	深色薛氏点/詹姆士点/点彩；在早期滋养体可能没有	在晚期滋养体和裂殖体可见不规则点彩
外周血原虫阶段	早期滋养体和配子体	所有阶段	所有阶段	所有阶段	所有阶段
多重感染红细胞	常见	少	偶尔	偶尔	常见
早期滋养体特征	纤细环状，小于 1/3 的红细胞直径，通常具有双核；常位于红细胞边缘（花环状）	环状体≤1/3 红细胞直径；核独立于环中央（鸟眼形式）	环状体≥1/3 红细胞直径；比恶性疟原虫的核大	环状体≥1/3 红细胞直径；与间日疟原虫相似	环状体≤1/3 红细胞直径；双核，少见绣花样；类似于恶性疟原虫早期滋养体
成熟滋养体	外周血通常不会见到，紧密厚环	致密胞浆，圆形、卵圆形、篮子状或带状，深褐色	阿米巴样滋养体，漂亮的金褐色	更致密，且不像间日疟原虫阿米巴样，深褐色	略像阿米巴；常见带状；散在分布金褐色团块；像三日疟原虫成熟滋养体
裂殖体特征	外周血通常不会见到，8～24 个裂殖子	6～12 个裂殖子，以中心色素呈放射状分布（玫瑰或雏菊头节肢动物）	12～24 个裂殖子	6～14 个裂殖子	10～16 个裂殖子
配子体特征	呈月牙形或香蕉形状；使红细胞变形	圆形至卵圆形；充满大部分红细胞	圆形至卵圆形；充满大部分红细胞	圆形至卵圆形；充满大部分红细胞	圆形至卵圆形；充满大部分红细胞

注：[a] 引自参考文献[13][23]和[36]；[b] 现在前往东南亚旅行的诊断为三日疟原虫感染患者应该考虑诺氏疟原虫感染，因两者的形态学相似。这种情况下所表现的重症临床病例及其高虫荷与诺氏疟原虫感染一致

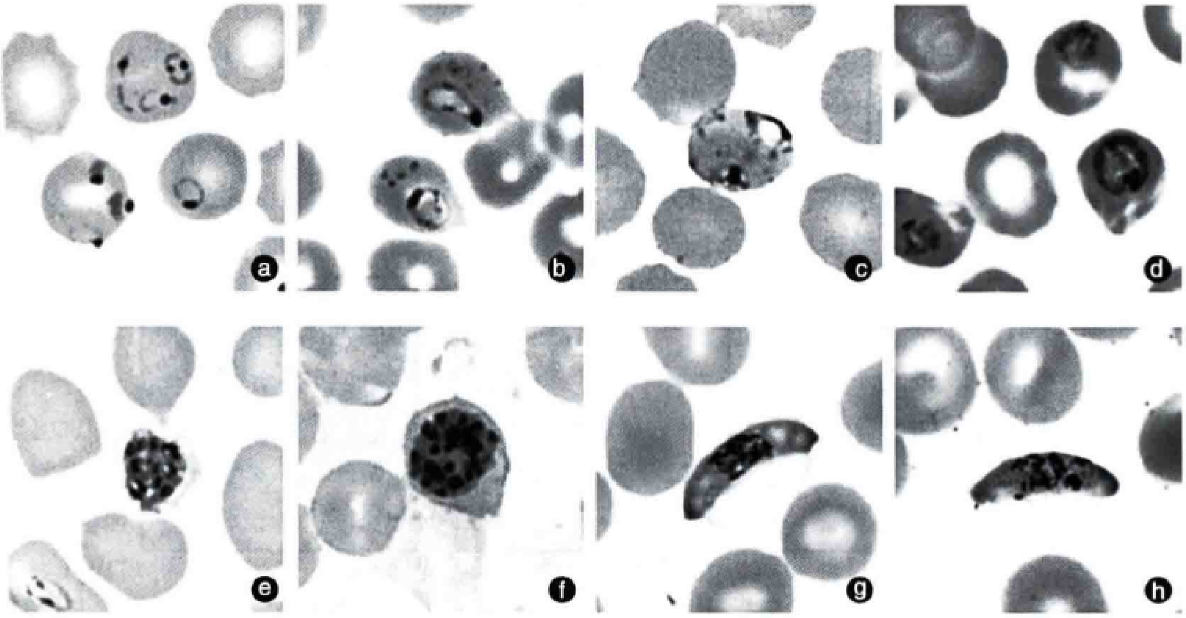


图 139-4 吉姆萨染色的薄血膜中呈现的恶性疟原虫的连续发育状态：早期滋养体/环状体，呈现耳机状(a)，环状体中的茂氏点(b)，环状体中的 appliqué forms 和茂氏点(c)，成熟滋养体(d)，早期裂殖体(e)，成熟裂殖体(f)(由 CDC DPDx 提供)，大配子体(g)，小配子体(h)。在外周血可见环状体(a、b、c)，少见的配子体(g、h)，而其他期的疟原虫(d～f)通常隐藏在微循环血管中，见彩插

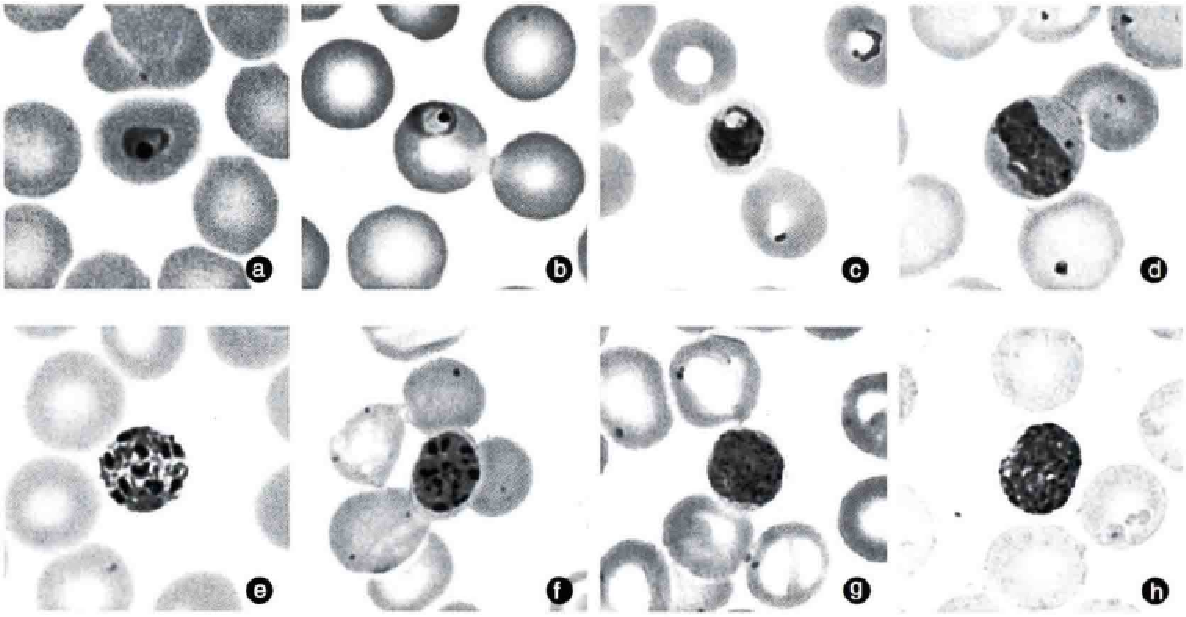


图 139-5 吉姆萨染色的薄血膜中呈现的三日疟原虫的连续发育状态：早期滋养体/环状体(a)，呈现"鸟眼"环状体(b)，篮子状的成熟的滋养体(c)，带状的成熟的滋养体(d)，成熟裂殖体(e)，呈现菊花状的成熟裂殖体(f)，大配子体(g)和小配子体(h)，见彩插

感染红细胞的大小是鉴定疟原虫种类的一项尤其重要的指标，因为涨大的红细胞是间日疟原虫和卵形疟原虫感染的特征，特别在疟原虫发育后期。三日疟原虫和恶性疟原虫感染的红细胞表现为缩小或正常形态。因此，仅该特征就能在鉴别诊断中快速划分为两类虫种。薛氏点有助于诊断卵形疟原虫和间日疟原虫感染。但值得注意的是，恶性疟原虫感染时会出现比薛氏点(Schüffner's stippling)更大更粗的茂氏点(Maurer's clefts)。点彩和茂氏点通常可在采血后即刻涂片且吉姆萨染色试剂 pH 7.0～7.2 时易见[30]。

疟原虫的生活史发育阶段对鉴定虫种也非常

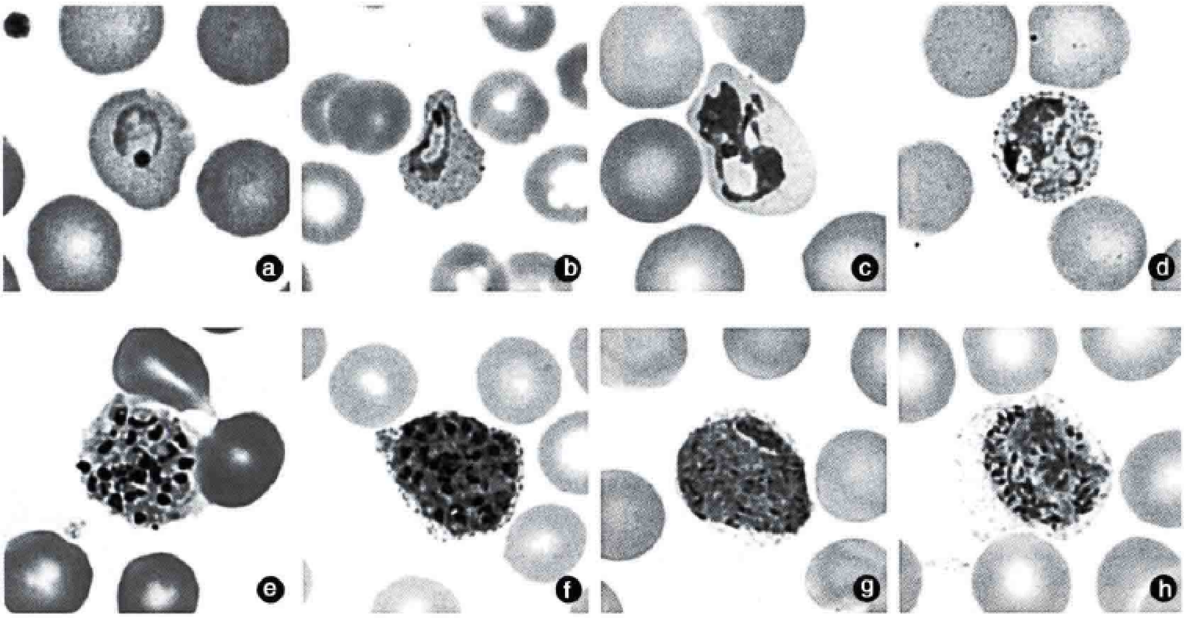


图 139-6　吉姆萨染色的薄血膜中呈现的间日疟原虫的连续发育状态：早期滋养体/环状体(a)，成熟环状体(b)，成熟的阿米巴样滋养体(c、d)，成熟裂殖体(e、f)，大配子体(g)，小配子体(h)。注意该虫中的薛氏点(b、d、f、h)，并且感染的红细胞经常与周围红细胞塑形，受感染的红细胞比未感染的细胞轻微胀大，见彩插

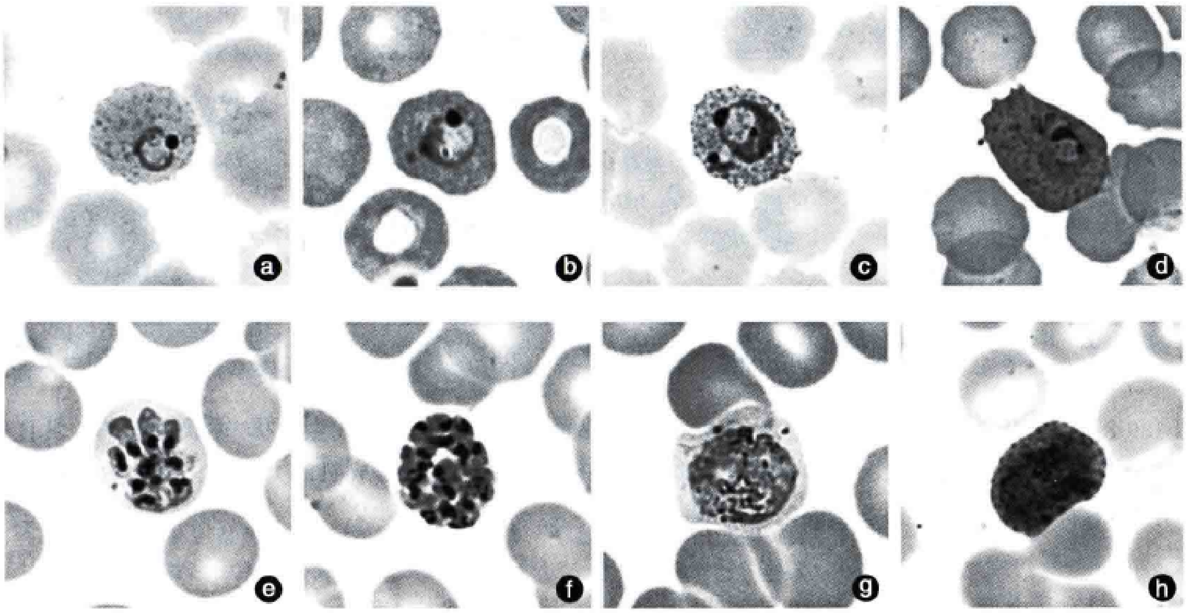


图 139-7　吉姆萨染色的薄血膜中呈现的卵形疟原虫的连续发育状态：早期滋养体/环状体(a、b)，发育中的滋养体(c)，"彗星"的成熟滋养体(d)，早期裂殖体(e)，成熟裂殖体(f)，大配子体(g)，小配子体(h)。注意该虫的薛氏点(c、d、h)，感染的红细胞呈现椭圆形/拉长状(d、f、h)。受感染的红细胞比未感染的细胞轻微胀大，见彩插

有帮助。恶性疟原虫感染常只有早期滋养体("环状体")和少量配子体；中间阶段(成熟滋养体和裂殖体)由于隐藏在微血管内而罕见。当见到恶性疟原虫中间阶段时，说明感染很严重。与恶性疟原虫不同的是，包括晚期滋养体和裂殖体在内的各个时期在其他几种疟原虫感染时都常见[36]。

值得注意的是，疟原虫混合感染并不少见，同一患者可能会同时感染恶性疟原虫和毒力较弱的疟原虫。同时，也要记住外周血涂片中可见其他寄生物，如红细胞内的巴贝虫(请见后面巴贝虫部分)，胞外微丝蚴(第 147 章)、锥虫(第 140 章)和螺旋体(第 61 章)，还可见到白细胞内的埃立克次体属/无形体属(*Ehrlichia*/*Anaplasma*)，尽管这不是检测这些细菌的首选方法(第 67 章)。

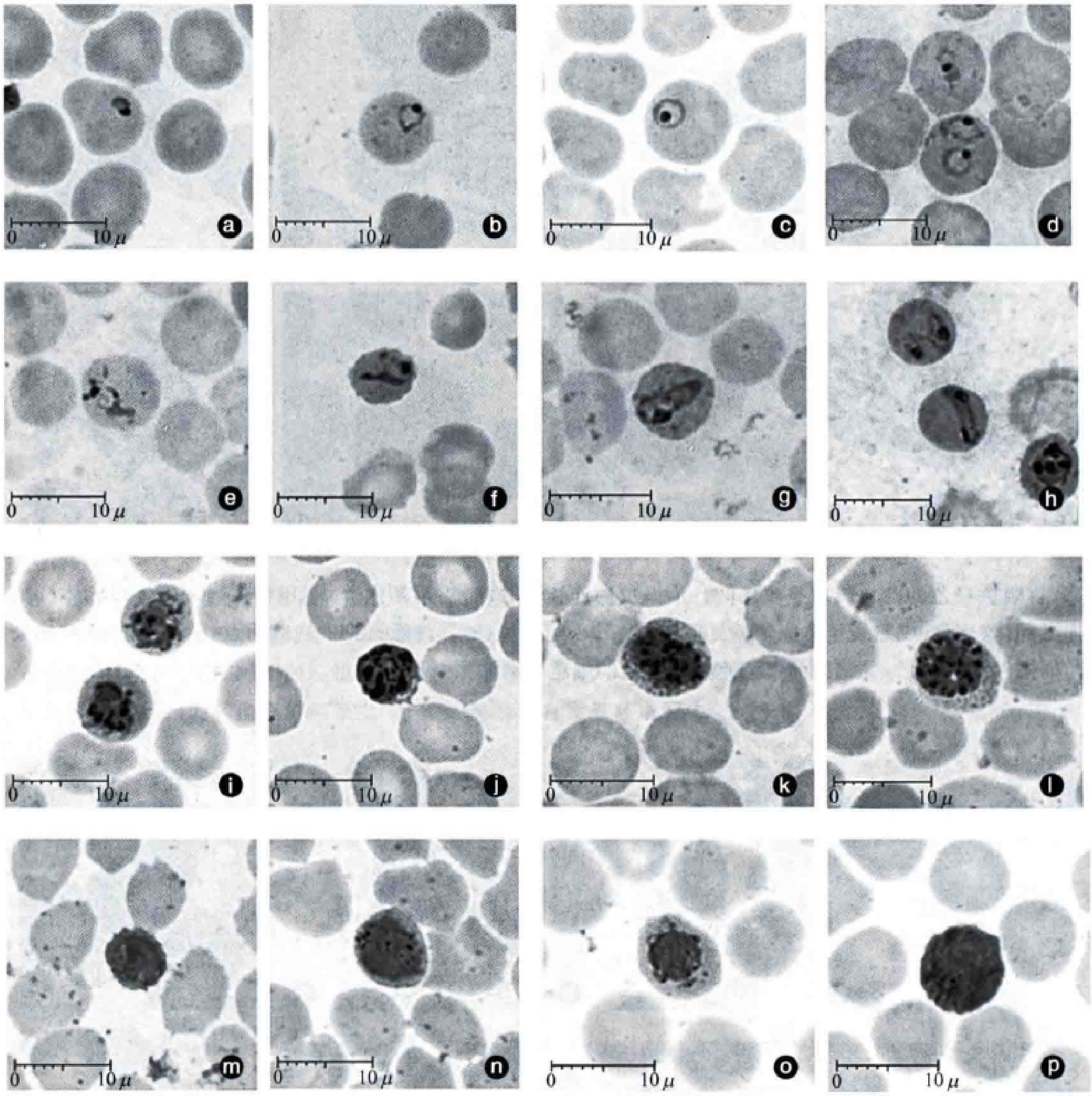


图 139-8 吉姆萨染色的薄血膜中呈现的诺氏疟原虫的连续发育状态：早期滋养体/环状体(a、b)，发育中的滋养体(c)，发育中的带状滋养体(d)，早期裂殖体(e)，成熟裂殖体(f)，成熟的大配子体(g)，成熟的小配子体(h)。(图片经授权转自文献[42])，见彩插

在鉴定疟原虫虫种时，寄生虫血症的定量对于指导初次治疗、预测患者预后及监测患者治疗效果等方面都具有很重要的意义。薄血膜和厚血膜均可定量寄生虫血症，并且规则已广泛应用[29-30,36,41,43]。当用厚血膜定量时，常用虫体数量与每微升血液中的标准白细胞数目(8000/μl)的相关性表示，若用患者已知的实际白细胞计数替代更好，用每微升血液中的疟原虫数目来报告结果。当使用薄血膜定量时，结果表示为视野中的感染红细胞百分比(感染细胞数/总红细胞数×100)。当用薄血膜和厚血膜计算寄生虫血症时，配子体无须计数，因为配子体对人不具有感染性且不能被抗疟药杀灭。在观察薄血膜时，即使视野中未找到疟原虫，也要保证连续视野的观察，而且细胞外的疟原虫不应计数。多重感染的红细胞应作为一个感染细胞计数。无论采用哪种方法计算寄生虫血症，需要注意的是在初始治疗和治疗后虫体的计数方法要保持一致[38]。另外，由于检测人员操作水平的差异，对同一患者的样本进行连续检测时，应尽量避免更换检测人员。

2. 其他镜检方法 在鉴定全血中的疟原虫时，其他镜检方法不常用，如核酸染色及疟色素(hemozoin)染色(表 139-3)。在这些方法中最常用的是吖啶橙(acridine orange)(AO)，其是一种

可与DNA结合的荧光染料，能在490 nm下激发产生黄色或苹果绿色的荧光[38]。该方法需要荧光显微镜或光学显微镜和合适的滤光片。成熟红细胞缺乏DNA，不产生荧光信号，而疟原虫含有DNA则产生明亮荧光，因此用该法鉴定感染细胞比较简单。但是白细胞核和红细胞中的豪-焦小体(Howell-Jolly bodies)也会发出荧光，此时便会对轻度感染的结果产生干扰。大量研究发现，AO染色法同吉姆萨染色厚血膜法的敏感性和特异性相当，即可检测到每微升血液小于100个疟原虫或0.002%寄生虫血症[38]。这种方法比传统的吉姆萨染色法的筛查速度更快[37-38,44]。另一种使用AO染色的方法是红细胞沉降率棕黄层定量分析法(QBC)，该法将全血用AO染色后放入毛细管中离心，然后对毛细管的棕黄层和相邻的红细胞层进行荧光显微镜观察[38]。临床研究证实，对于恶性疟原虫QBC方法的敏感性和特异性最好，原因在于恶性疟原虫早期滋养体在红细胞层很容易被发现[38]。该法对于其他疟原虫的诊断敏感性较低，主要因为其他疟原虫的成熟滋养体、裂殖体和配子体存在于粒细胞层。由于疟原虫的早期滋养体较难鉴别，因此很难做出虫种确诊。如果采用DNA结合荧光染料方法时，注意不要将染色阳性的核碎片和豪-焦小体错认为寄生虫[38]。

表 139-3 疟疾诊断方法比较[a]

方法	检测	优点	缺点	评论	参考文献
吉姆萨染色	厚血膜	筛查血量大；敏感性高	主观；不易进行虫种鉴定	金标准；对镜检员技术要求高	23,30,36,39,41,43
	薄血膜	保持疟原虫形态；便于虫种鉴定	主观；筛查敏感性比厚血膜低	鉴定虫种金标准；对镜检员技术要求高	
DNA/RNA荧光染色	AO或者BCP染色	可减少筛查时间	非特异染色；结果可能难解释	要求荧光显微镜	44,128
	QBC疟疾(微量血细胞比容管内的AO染色的血液)	快速，筛查血量大；对恶性疟原虫高度敏感和特异性；离心分离血液成分和寄生虫有利于筛查	非特异染色；难以鉴定虫种和计算感染密度；对于非恶性疟原虫的检测敏感性低(早期滋养体以外的阶段都在粒细胞层)	要求荧光显微镜或荧光滤光片和离心机	38,129-131
疟色素检测	流式细胞仪	自动	敏感性不稳定		132
	暗视野显微镜	不需要染色。巨噬细胞中出现大量的色素说明	敏感性低，预后差		38,133,134
	组织学/FFPE组织	可同形态学特征相对应	要求进行组织活检；疟色素有可能同甲醛或硅沉着病色素沉积混淆		135
抗原检测	检测HRP-2，醛缩酶及LDH试剂盒	快速、方便、结果容易解释；一些试剂盒适用于野外	与血片检测相比费用高；轻度感染和非恶性疟原虫检测敏感性不稳定	不同试剂盒的检测性能差异大	46
核酸检测	DNA/RNA杂交	无需扩增；无需PCR那样的防样本污染对照	敏感性低，成本高，仪器设备要求高	第一种核酸检测方法；临床应用少	136,137
	PCR	敏感性和特异性高，与镜检相当或优于镜检；可检测混合感染	成本高，仪器设备要求高；样本污染风险高；检测速度慢	多个实验室建立了检测方法；没获FDA批准；仅限于参比实验室和公共卫生实验室的临床应用	35,53,57-59,138
	环介导等温扩增(LAMP)	敏感性和特异性等同于PCR，一些检测适用于野外	成本高(但低于PCR)，目前没有商品化产品	临床未广泛应用；未获FDA批准	35,139

注：[a]AO. 吖啶橙；BCP. benzothiocarboxypurine；FFPE. 甲醛固定和石蜡包埋；HRP-2. 组氨酸丰富蛋白2；LDH. 乳酸脱氢酶；QBC. 红细胞沉降率棕黄层定量分析法

通过暗视野显微镜(dark-field microscopy)或组织切片观察疟色素(疟原虫色素)较为少见。疟色素主要集中在肺、肾、肝、脑和胎盘等感染器官中毛细血管内黏附的红细胞和巨噬细胞(图139-9)。



图 139-9 由恶性疟原虫引起的脑型疟的组织切片(HE,×400)。图片中间的毛细血管中有多重感染的红细胞,黑褐色的疟色素明显,见彩插

3. 抗原检测(antigen detection) 在过去十多年,已出现很多商业化的快速检测疟原虫抗原的免疫层析方法(immunochromatographic tests)[38,45-46]。该检测通常被称为快速诊断试剂(rapid diagnostic tests,RDTs),其特点是快速和相对容易操作,特别是在现场检测时结果稳定[46]。

目前,商业化的抗原检测方法主要针对疟原虫乳酸脱氢酶(parasite lactate dehydrogenase,pLDH)、恶性疟原虫组氨酸丰富蛋白2(Pf-HRP-2)和疟原虫醛缩酶[36]。其中一些产品专门检测恶性疟原虫和(或)间日疟原虫,另一些则仅提供总的疟原虫检测结果。目前,没有专门检测卵形疟原虫、三日疟原虫或诺氏疟原虫的产品[45]。现阶段FDA唯一批准的RDT是BinaxNow Malaria Test(Alere,Inc.,Waltham,MA),用来检测恶性疟原虫Pf-HRP-2抗原和泛种疟原虫抗原。在美国以外有很多商业化的检测试剂,包括一部分欧盟市场批准的试剂[46-47]。

通常,在中度和高度感染的情况下,疟疾RDTs检测对恶性疟原虫的检出率与显微镜检查基本一致,但在非恶性疟原虫感染或各种疟原虫轻度感染情况下,敏感性较低[38,45-46]。而在临床病例中,疟原虫感染密度为每微升血液100个(0.002%的寄生虫血症)较为常见,但是即使是恶性疟原虫感染,很多RDTs均不能有效检出该感染水平下的寄生虫[38,45]。WHO、促进创新诊断方法基金会(FIND)及热带病研究和培训特别规划署(TDR)在2006年启动了一项大规模研究,比较了商业化的RDTs在检测高密度感染(每微升2000～5000个)和低密度感染(每微升200个)恶性疟和间日疟时的检测效果[46],结果表明,在120个RDTs产品中,不同的试剂盒、生产厂家甚至批号都对检测的结果有很大的影响[34]。该研究显示,FDA批准的BinaxNow Malaria Test在检测高密度感染的恶性疟时敏感性高达100%,但在检测低密度感染的恶性疟、高密度和低密度感染的间日疟时的敏感性分别为91.1%、85%和10%[34]。尽管有些RDTs比BinaxNow test的敏感性和特异性要好,但在美国并未获批用于体外诊断[34]。

同时需要注意,与许多免疫层析方法一样,在自身抗体如类风湿因子存在的情况下可出现假阳性。患者治愈后数日内仍能检测到抗原,因此,RDTs不能用于治疗效果的监测[45]。当使用RDTs检测Pf-HRP2时,可出现*pfhrp2*或*pfhrp3*检测结果的假阴性[48]。而且妊娠妇女的恶性疟原虫检测敏感性下降,可能原因是寄生虫抗原被阻滞在胎盘中[49]。

鉴于RDTs的局限性,通常建议所有RDTs检测结果需要用标准厚和薄血膜进行确证[36,38]。在美国和欧洲等非疟疾流行区,使用RDTs对缺乏传统血片镜检技能及有更加快速即时检测要求的实验室是有帮助的[50-52]。在STAT实验室及在晚班进行检测且缺乏有经验的血片镜检技术人员时,快速诊断试剂就非常便利,在上述情况下,对高原虫密度恶性疟原虫感染者快速检测的能力有助于拯救患者生命。

4. 核酸检测 文献报道很多核酸检测方法可以用于临床检测,包括DNA/RNA杂交、PCR、核酸序列依赖性扩增(NASBA)和环介导等温扩增技术(LAMP)[35]。最常用的核酸检测方法是PCR,而18S rRNA基因是最常用的靶点[35]。很多文献都报道了常规PCR[53-55]及real-time PCR[56-60]的标准方法,可用于疟原虫的检测、虫种鉴别(可包括 *Plasmodium ovale curtisi* 和 *P.*

ovale walliker 的鉴定)及疟原虫抗性标记的鉴定(具体参见下文的"治疗和预防部分")。但大多数PCR检测方法仅限于实验室应用,虽有一些欧盟批准的商业化检测试剂盒,如Artus Malaria RG PCR试剂盒,RealStar Malaria PCR试剂盒,检测间日疟原虫的Geno-Sen's Malaria Real Time PCR试剂盒及Malaria RealAMP试剂盒。Loopamp Malaria Pan/Pf试剂盒和Illumigene Malaria试剂盒也在欧盟市场上市,利用LAMP技术可鉴定疟原虫到属的水平。Loopamp有检测恶性疟原虫的引物。遗憾的是,都尚未被FDA批准用于体外诊断。

虽然发表的结果存在很大差异,但基于PCR的检测敏感性普遍被认为要优于传统厚血膜检测,其检测限低于每微升血液10个疟原虫。英国伦敦国家医学研究所的科学家报道了一种传统的巢式PCR方法,可检测到每微升血液最少6个疟原虫[61],而有报道称逆转录实时定量PCR检测限为每微升血液0.002个疟原虫[35,62]。WHO[63]可提供标准化定量的恶性疟原虫,以用于各实验室确定新的和已有的分子检测方法的敏感性。

疟原虫核酸检测主要限于在特定的参比实验室或公共卫生实验室开展,不适用于临床快速诊断。然而,该法在检测低原虫血症、确认疑似感染、区分疟原虫和巴贝虫感染、虫种鉴定及混合感染的敏感性检测等方面具有重要意义[36]。

尽管PCR有其潜在优势,但由于其较高的费用和专门的仪器设备,使其在资源有限的流行病区应用颇具挑战。幸运的是,等温扩增技术,如基于核酸序列的扩增(NASBA)和环介导等温扩增(LAMP)等方法,分别提供了更简单、更廉价的疟原虫DNA和RNA检测方法[64-65]。最近报道了一个利用氧化钙供热的方法,可在没有电流的容器中进行疟疾LAMP检测[66]。而其他疟原虫核酸扩增方法,包括核酸侧流免疫测定(NALFIA)[67]和基于PCR的酶联免疫吸附试验(PCR-ELISA)[68],可能适用于资源缺乏的地区。上述替代方法还需要在临床研究中验证其性能特征。

当疟原虫的核酸检测结果为阳性时,仍需要进行厚血膜或薄血膜的检测以确定寄生虫血症比例。因主观手工计数疟原虫的方法缺乏重复性,定量PCR有可能在未来取代人工计数疟原虫的方法。但是,目前的定量PCR结果与传统方法获得的寄生虫血症百分率结果还不一致,究其原因,传统计数方法不包括配子体和细胞外的疟原虫,且多重感染的细胞只计数1次,而PCR检测的是标本中每个疟原虫的核酸。

(七)血清学试验

鉴于急性期患者体内尚无相应抗体,血清学试验在这种疟疾感染的诊断中作用较小。而且阳性结果仅表示以前曾经感染过,无法区分现症和既往感染。因此,血清学试验方法主要在流行病学研究和献血者筛查[54]中使用,偶尔可用于评估复发、再燃或未治愈的无免疫力患者。基于4种人类疟原虫制备的抗体进行间接荧光抗体(IFA)检测以前已有阐述[70-71],需要在专业检测设备中使用,试验耗时且主观,但具有高度敏感性和特异性。

(八)其他实验室诊断方法

其他非传统的实验室诊断技术包括,检测全血中疟色素的激光解吸电离质谱[72]及经完整皮肤检测疟色素生成的蒸汽纳米泡[73]等,均有希望发展成为快速且容易开展的疟疾诊断方法。

(九)治疗和预防

很多药物用于治疗疟疾,如氯喹(chloroquine)、甲氟喹(mefloquine)、奎宁(quinine)、奎尼丁(quinidine)、氯胍阿托伐醌(马拉龙)[atovaquone-proguanil (malarone)]和蒿甲醚-苯芴醇(复方蒿甲醚)[artemether-lumefantrine (coartem)][27,74]。根据疾病的临床严重程度、感染地区、药物耐药性(如已知)和疟原虫种类选择治疗方案[27,74]。如果感染的是卵形疟原虫或间日疟原虫,必须在标准抗疟疾治疗方案中加入伯氨喹(primaquine),主要是杀死肝脏中的休眠子,因此实验室准确鉴定虫种非常重要[27]。对于疟原虫血症≥10%的患者,可进行部分或全部红细胞替换治疗。美国血液透析协会支持此种疗法,但是CDC已不再推荐[28]。

疟原虫对抗疟药物的耐药性是全球面临的严重问题[75-77]。氯喹作为治疗和预防的主要药物应用了多年,但是因为恶性疟原虫对其产生的普遍耐药性,已被氯胍阿托伐醌(马拉龙)、多西环素、磺胺多辛-乙胺嘧啶等药物替代[76]。目前,仅在墨西哥、加勒比海地区及中东和中美洲部分地区仍发现对氯喹敏感的恶性疟原虫[75-76]。在一些流行

病区，还出现了对甲氟喹和磺胺多辛-乙胺嘧啶耐药的恶性疟原虫及对氯喹和伯氨喹耐药的间日疟[75-76,78-79]。对奎宁抗药(quinine resistance)的报道较为罕见，因此，可将其作为重症疟疾的治疗药物[80-81]。青蒿素类药物[如青蒿琥酯(artesunate)、蒿甲醚(artemether)等]是治疗疟疾的优势药物，且被WHO推荐为一线治疗药物，同其他抗疟药联合用药(ACT)治疗非重症和重症疟疾病例[74,77]。已在泰柬边境(大湄公河区域)疟疾耐药区发现恶性疟原虫体内对青蒿素药物的敏感性下降[77,82]。在大湄公河区域以外，ACT治疗失败并非是对青蒿素类药物耐药，而是对青蒿素外的联合药物耐药。尚未发现高水平的青蒿素类药物耐药(artemisinin resistance)[77]。因此，迫切需要采取相应的干预措施，以防止青蒿素耐药恶性疟原虫虫株的全球传播。

可用体外药物敏感性试验检测疟原虫的耐药性[83]，但是该方法不适用于临床。更实际的方法是检测与抗药性相关的单核苷酸多态性(single-nucleotide polymorphisms)，通常的检测位点有*dhps/dhft*(磺胺多辛-乙胺嘧啶)、*Pfcrt*(氯喹)、*pfmdr*(氯喹、甲氟喹和奎宁)及*pfATPase6/pfmdr*和*PfKelch13*(青蒿素)[78]，检测方法为PCR[60]或者DNA芯片[76-77,81,84]。很多国家实验室进行抗疟疾药物耐药突变基因的分子扩增和测序检测，目的是为了治疗和(或)流行病学需要，包括美国(CDC)、加拿大、英国、欧盟和中国的实验室[27]。有关寄生虫药物敏感性测试的内容详见第154章。

(十)结果的评价、解释和报告

任何方法进行疟原虫检测的结果都很重要，须立即报告给临床医生。血涂片评估的最终报告结果应该包括疟原虫的虫种及寄生虫血症的计算程度。尤其是怀疑混合感染和恶性疟原虫感染后期时，及时报告血涂片结果更为重要，因为这些发现对疟疾的治疗具有更为重要的指导意义。同样，当无免疫力患者的疟原虫密度超过每微升血液100 000个(约2%寄生虫血症)时，提示为危重病例，需要紧急治疗[24]；而疟原虫感染水平高于10%时，需换血，尽管CDC已不提倡这种疗法[27,28]。还需要告知临床，一套阴性血片结果并不能排除疟原虫感染，如果临床怀疑疟疾，应制作系列血涂片进行观察[30]。

建议对疟疾患者进行连续血涂片检查，以监测抗疟疾治疗反应。主要根据患者的严重程度决定血涂片检查的频率，对于重症疟疾的患者应至少每天检查血涂片[27]。有效治疗后的2～3天在重复检查血片中可见无性期的疟原虫；最初治疗12～24 h后重复检查血涂片可观察到疟原虫密度增加。如果在首次治疗后的36～48 h内疟原虫密度未下降75%或3天后仍可查见疟原虫，则考虑出现耐药性或患者服药依从性差[25,27]。因为配子体不能被大多数抗疟药杀灭，因此其可能循环2周甚至更久时间，在计数时配子体不计数或单独报告[27]。

如果实验室缺乏疟原虫虫种鉴定及鉴别疟原虫和巴贝虫的能力，则需通知临床医生已检出疟原虫或巴贝虫，同时血样或血片应送到参比实验室或公共卫生实验室进一步分析。在初步报告时应提及不能排除可能致命的恶性疟原虫。CDC的寄生虫病和疟疾部门为国内和国际患者无偿提供快速远程诊断服务(http://cdc.gov/dpdx/contact.html)[27]。

三、巴贝虫

(一)病原描述

巴贝虫主要通过硬蜱传播，可感染多种家畜和野生动物，范围遍及全球[85]。目前已被命名的巴贝虫种数量过百，然而以人作为常规宿主的种类却寥寥无几[85]。在美国，绝大多数患者感染的是田鼠巴贝虫(*Babesia microti*)。人感染邓肯巴贝虫(*B. duncani*)和拟邓肯巴贝虫(*B. duncani-like*)的报道仅见于华盛顿州、俄勒冈州和加利福尼亚州[86-88]；而在肯塔基、密苏里和华盛顿州，有极少数拟分歧巴贝虫(*B. divergens-like*)(如MO-1株)病例报道[85,89]，在楠塔基特岛的棉尾兔上也检测到拟分歧巴贝虫[90]。在欧洲，大多数患者感染的是分歧巴贝虫(*B. divergens*)，亦有较少数感染田鼠巴贝虫和维氏巴贝虫(*B. venatorum*)病例报道[91-94]。人类感染其他种类巴贝虫病例在世界其他地区也时有报道，如中国台湾[95]，以及日本[96]人群中发现有拟田鼠巴贝虫感染；中国报道的维氏巴贝虫感染病例[97]；韩国发现的新巴贝虫株KO-1可感染人类[98]；墨西哥、巴西、哥伦比亚、

埃及、莫桑比克、南非和印度则发现了尚未分类的可感染人的虫株[85]；一些罕见的未确诊病例也被认为与犬巴贝虫（*B. canis*）及牛巴贝虫（*B. bovis*）感染有关[99]。

根据虫体大小，巴贝虫通常分为大、小两种，田鼠巴贝虫和分歧巴贝虫均属小巴贝虫（滋养体<2.5 μm）[91]。随后，研究者应用 18S rRNA 基因的遗传分析阐明了巴贝虫的系统发生，并将梨形虫分为 4～5 个分支[91,100]。最近人们对田鼠巴贝虫基因组测序，发现它是目前已经测序的顶复门寄生虫中最小的基因组，大约含有 3500 个基因[101-102]。同时研究显示，田鼠巴贝虫与其他巴贝虫在基因进化上关系相差较远，可单独形成一个虫属[85]。

（二）流行病学和传播特点

巴贝虫病分布于温带地区，包括北美和欧洲的部分地区，不同于疟疾的地理分布。在美国，微小巴贝虫感染致病常见于东北部沿海（如玛莎葡萄园岛、楠塔基特岛和长岛）、上中西部地区及大西洋和中南部各州。同时密苏里州、肯塔基州、华盛顿州、俄勒冈州和加利福尼亚州亦有少数感染其他巴贝虫种病例报道[85]。自 2011 年 1 月 1 日开始，全美开展了一项针对巴贝虫病的监测，覆盖巴贝虫病流行的 18 个州和纽约市[103]。第一年就报道疑似和确诊病例 1124 例，多数集中于以下 7 个州（以病例数量递增顺序排列）：明尼苏达州、罗得岛、康涅狄格州、威斯康辛州、新泽西州、马萨诸塞州和纽约州。大部分患者年龄在 60 岁及以上（1～98 岁），多数未主诉蜱虫叮咬史[103]。美国 CDC 最新的巴贝虫病例监测是 1744 例，94%的病例仍然来自上述 7 个州[104]。鉴于大部分感染巴贝虫的人并无临床症状，实际感染人数预计远高于报道数。

欧洲报道的巴贝虫病显著少于美国。迄今为止，欧洲仅报道 30 余例由分歧巴贝虫感染引起的巴贝虫病病例，主要来自于法国、英国和爱尔兰，另外只有零星的感染维氏巴贝虫和田鼠巴贝虫的病例记载[85,105]。分歧巴贝虫主要引起牛巴贝虫病，对畜牧业经济影响非常大[106]。

许多巴贝虫病由感染的硬蜱叮咬所致（图 139-10）。自然情况下，该病在无脊椎动物与脊椎动物宿主之间传播。人类对巴贝虫易感，但被认为是终宿主。美国和欧洲巴贝虫病最常见的传播媒介分别是肩突硬蜱［*Ixodes scapularis*，又称黑腿壁虱或鹿蜱（deer tick）］和蓖子硬蜱［*Ixodes ricinus*，又称羊蜱（sheep tick）］[85]。田鼠巴贝虫在美国的脊椎动物宿主以白足鼠（*Peromyscus leucopus*）为主，而在欧洲主要是其他啮齿动物和鼩类[85]。分歧巴贝虫和维氏巴贝虫在欧洲的主要宿主分别是牛和鹿。与疟原虫类似，巴贝虫子孢子经蜱虫叮咬侵入人血液循环系统，直接感染红细胞，形成滋养体。巴贝虫没有像疟原虫一样的肝期，故没有红细胞外的潜伏期。与疟原虫裂体增殖不同，巴贝虫滋养体通过出芽方式无性繁殖，形成类似裂殖子和配子体的形式[99]。裂殖子由感染的红细胞裂解释放入血，然后，感染其他正常红细胞。和疟原虫相似的是，巴贝虫配子受精的有性生殖阶段发生在节肢动物肠道，受精配子穿过肠壁移行至唾液腺发育成孢子母细胞。蜱吸食血液时，孢子母细胞最终发育成熟为子孢子，子孢子于蜱吸血即将结束前进入被叮咬的宿主体内。巴贝虫病的流行随媒介蜱的活动规律呈现季节性消长，多数病例发生于春、夏、秋三季[85]。

人可通过输入感染的血液制品[107]或由胎盘垂直传播[108]感染巴贝虫，但是这 2 种情况并不多见。在美国，输血已成为巴贝虫感染增多的重要因素[85,107,109]，2014 年输血导致 6 人感染田鼠巴贝虫[104]，而 1979－2009 年美国输血导致巴贝虫病 159 例，包括 156 例田鼠巴贝虫病和 3 例邓肯巴贝虫病[109]。近期报道了 1 例疑似由输血感染的拟分歧巴贝虫病例[110]。上述病例数显著高于欧洲报道的输血传播巴贝虫病例数[107]。带虫的献血者多见于蜱活跃的季节，与该病季节消长规律相吻合；冬季获得捐献的血液也可有感染性，推测是由于献血者在蜱叮咬季节感染后，巴贝虫在其血液中休眠数月而未引起症状。多数输血传播的病例由输注全血导致，但也有报道认为输注分离自全血的血小板亦可导致巴贝虫感染[107,109]。美国红十字会估计，在疾病流行的各州，输血感染巴贝虫的概率约为 1/100 000，而在疾病高度流行的州，这个概率上升到 1/18 000[107,111-112]。

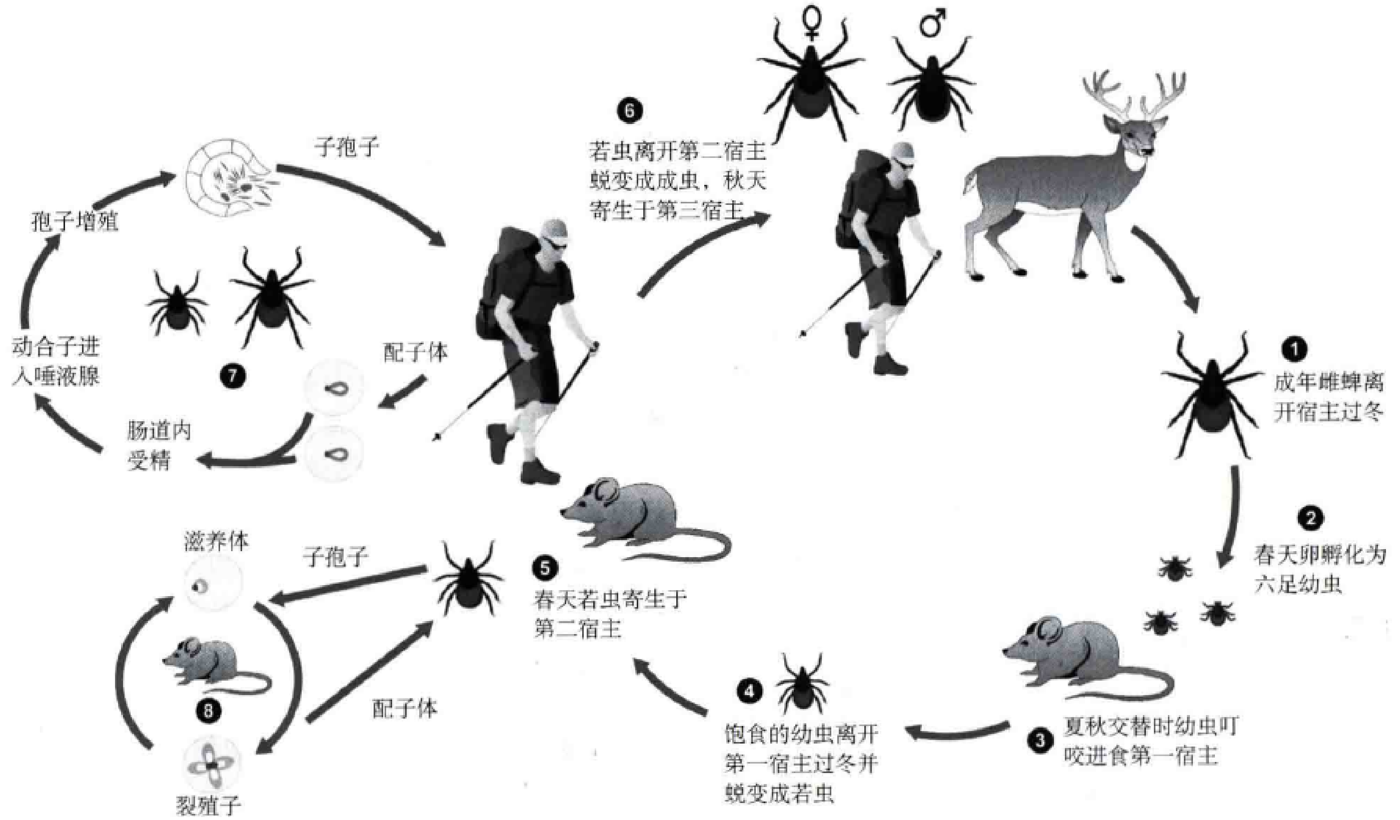


图 139-10 肩突硬蜱和田鼠巴贝虫的生活史(life cycle)。肩突硬蜱的生活史有 4 个阶段，一般持续 2 年，其中包括脊椎动物宿主(啮齿类、鹿或人类)时期，硬蜱在活动期吸食不同宿主的血液。第一年，交配的成年雌蜱离开脊椎动物宿主过冬①，并于春天产卵。春天卵孵化②，孵化出的幼虫寄生在第一脊椎动物宿主，通常为小型啮齿类动物或鸟类③。六足幼虫以第一宿主为食，一般于夏末时，幼虫吸食宿主血液可感染田鼠巴贝虫。饱食的幼虫离开宿主过冬，进一步蜕皮成为若虫④。第二年的春天，若虫寄生在第二脊椎动物宿主(如啮齿动物、鹿或人类)⑤，在秋天时若虫离开第二宿主，蜕变成成虫，寄生在第三脊椎动物宿主(如鹿和人类)⑥。田鼠巴贝虫的生活史包括两个宿主寄生阶段，分别是肩突硬蜱的终末宿主时期和脊椎动物中间宿主时期。在蜱虫体内⑦，由于进食血液吸入的配子体进行有性繁殖，形成具有感染性的子孢子。在啮齿动物或人类等哺乳动物宿主⑧，子孢子进入红细胞内，形成滋养体，滋养体以出芽的方式进行无性二分裂增殖。接着滋养体发育为裂殖子，红细胞破裂，释放出来的裂殖子继续感染正常红细胞，这个红内期循环往复，或者在蜱虫进食血液时吸入配子体，开始有性生殖阶段。所有肩突硬蜱的活动期，均可从感染的第一或第二脊椎动物宿主体内感染田鼠巴贝虫，但是，只有若虫和成虫可传播寄生虫。图片已授权[127]，见彩插

(三)临床表现

由田鼠巴贝虫或邓肯/拟邓肯巴贝虫感染引起的巴贝虫病可无症状或仅有轻微症状，也可严重危及生命[85]。在脾功能正常患者，田鼠巴贝虫感染一般症状较轻，表现为发热和非特异性流感样症状；在无脾患者，症状较重，表现为高热、寒战、盗汗、肌痛、溶血性贫血、血尿、肝脾大和黄疸等严重症状，还可引发弥散性血管内凝血、急性肾衰竭或呼吸衰竭、充血性心力衰竭和昏迷等危及生命的并发症。除了无脾症，免疫功能抑制和高龄均为出现严重症状的危险因素[91]。

感染分歧巴贝虫的欧洲患者通常伴有无脾症或免疫抑制，症状十分严重，这与多数感染拟分歧巴贝虫的美国患者类似。感染维氏巴贝虫的病例报道很少，但初步证据显示其症状相对较轻[91]。

(四)治疗和预防

建议治疗有临床症状的巴贝虫病[113]。口服阿奇霉素和阿托伐醌(atovaquone)用于治疗轻度到中度的巴贝虫病，克林霉素静脉用药和口服奎宁治疗重度巴贝虫病[113]。也可使用红细胞换血疗法治疗中度巴贝虫病和(或)≥10%的寄生虫血症[113-114]。

巴贝虫病主要通过避免流行区蜱虫叮咬预防，如采用含 N，N-二乙基-甲基-甲酰胺的驱蜱虫剂喷洒暴露的皮肤部位、苄氯菊酯(permethrin)喷

洒衣物；避免前往落叶森林和高草区这些蜱虫栖息地；经常检查是否有蜱虫叮咬并除去[105]。对于处于重症巴贝虫病高风险的患者，如免疫缺陷人群和无脾人群，这些预防措施尤为重要[105]。也可采取缩小住所周边蜱虫栖息地范围的方法预防，如经常割草、打扫落叶和用杀螨剂喷洒植物。在高流行区，社区宣教也是巴贝虫病预防措施的重要组成部分[105]。

输血传播的巴贝虫病仅靠献血者问卷调查和无限期推迟有巴贝虫病史的献血者献血 2 种方法来预防[105]。输血引起的病例数在美国呈上升趋势，因而建立一种可行且性价比高的血液制品筛选方法非常必要[112]。目前，并没有 FDA 批准的以此为目的的相关检测方法[107,112]。尽管如此，自从 2012 年以来，美国红十字会一直采用一套研究性流程对来自美国高流行病区的献血员进行巴贝虫感染筛查。根据这套流程，首先使用 PCR 和血清学方法对标本进行检测，如果标本阳性，则采用另一种更敏感的 PCR 和蛋白印迹方法复核标本。美国红十字会报道，在流行病区，每 300 个献血者有 1 例感染巴贝虫[111]。

(五)标本的采集、运输和储存

检测巴贝虫病全血标本的收集及运输和疟疾遵循相同的原则。田鼠巴贝虫的主要媒介肩突硬蜱可能携带其他蜱传疾病的病原体，如致无浆体病的嗜吞噬细胞无形体和致莱姆病的伯氏疏螺旋体，故应加强对相关病原的同时监测[115]。重要的是，最近研究发现田鼠巴贝虫和伯氏疏螺旋体的共同感染促进田鼠巴贝虫从蜱虫到人类的传播，导致更严重的疾病。

在采制血涂片的同时，应注意收集患者的其他重要信息，例如，临床症状和体征、居住地、旅行史、免疫状态和脾功能正常与否。

(六)直接检测

1. 显微镜检查(microscopy)　诊断巴贝虫病的传统方法是吉姆萨染色厚和薄血涂片的镜检，这与疟疾相同[85,114]。血涂片制备和应用说明详见前述疟疾部分。

在两种血涂片上，巴贝虫和疟原虫（尤其是恶性疟原虫）的形态都极为相似，很难区分（图 139-11 和图 139-12），通常可借助一些特征加以辨别（表 139-4）。巴贝虫在镜下可呈现卵形、椭圆形、梨形、球拍形和纺锤形，通常在大小和形状上比恶性疟原虫更加多样，常见细胞外虫体，很少见到典型的十字交叉（马耳他十字）；巴贝虫病患者的血涂片只能查到环状体，这一特征非常重要；此外还可依据血涂片中深染颗粒、疟色素、裂殖体或疟原虫型的配子体的形态特征来排除巴贝虫感染。感染人的巴贝虫种类仅凭形态学特征无法确定，还需通过分子检测才能加以鉴别。

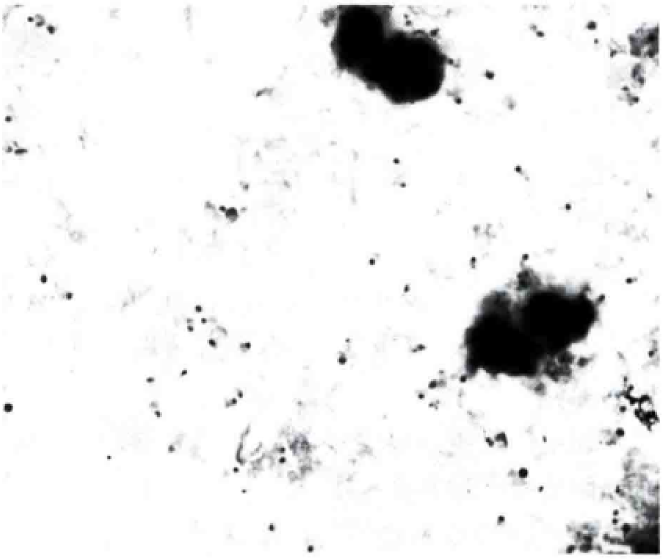


图 139-11　厚血膜涂片中巴贝虫形态，可见类似恶性疟原虫滋养体的环状体，多形性较明显，见彩插

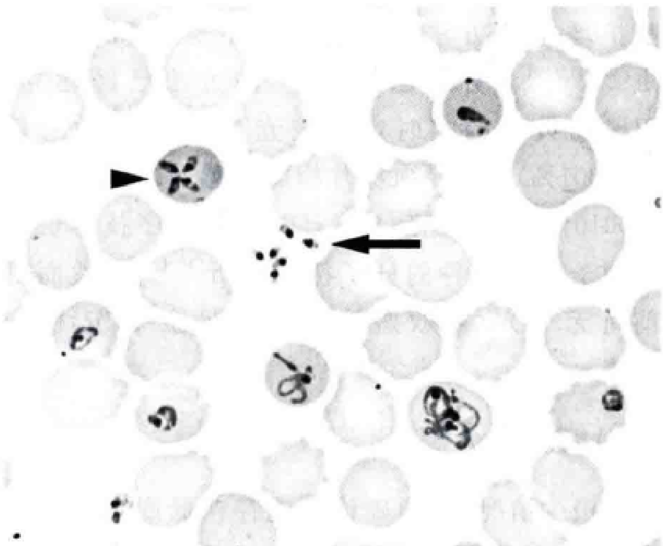


图 139-12　薄血膜涂片中巴贝虫形态，红细胞内可见小环状体，类似恶性疟原虫早期滋养体，以及有明显的多形性的较厚的环状体；同时可见典型的细胞外形态（箭）和四分体形式（箭头），见彩插

表 139-4 巴贝虫和恶性疟原虫形态比较

鉴别特征	恶性疟原虫	巴贝虫
受感染 RBC[a] 大小	正常	正常
外周血寄生虫阶段	环状体，不太常见的新月形配子体；可有高寄生虫血症；其他阶段很少见到	只可见环状体；红细胞严重感染多见
寄生虫特征	环状体纤细，直径小于红细胞直径的 1/3；可有耳机和花环形成；常见多重感染红细胞	环状体纤细，直径为红细胞直径的 1/3～1/6；多形态，可呈卵圆形、纺锤形和阿米巴形；多重感染红细胞常见；可见单个或多个染色质点；四分体形式较少见
红细胞内容物	偶见茂氏点	无
胞外形态	罕见	常见
色素	棕黑色疟色素	无
周期性发热情况	36～48 h	无周期性
流行区域	热带和亚热带地区	温带地区

注：[a] RBC. 红细胞

另外，了解患者完整的旅行史，增加血样检测次数或更换 PCR 等检测方法，都可帮助鉴别巴贝虫和疟原虫感染。

确定巴贝虫感染程度有助于患者管理。患者血液原虫水平通常在 1%～10%，但有时也可高达 80%[85,91]。免疫功能低下和无脾症患者有病程延长或复发的风险，对其进行监测并给予针对性治疗，对巴贝虫病的控制尤为重要[116]。

2. 核酸检测 当患者血液中巴贝虫数量较少或无法借助形态学诊断时，可辅以 PCR 等核酸扩增检测方法。目前实验室检测田鼠巴贝虫[35,117-120]和分歧巴贝虫[120]的方法已经建立。田鼠巴贝虫的实时定量荧光 PCR 检测敏感性(0.0001%)优于厚血涂片检测敏感性(0.0002%～0.0010%)[35]。基于 18S rDNA 的测序技术也已应用于巴贝虫种的分子特征分析[92,120]。然而目前尚无 FDA 或欧盟认证的巴贝虫 PCR 检测方法。

(七)病原体分离

极少情况下，为确诊可能存在低度感染或仅有 DNA 检测阳性指征的疑似巴贝虫病(babesiosis)患者，有必要将患者血液接种至实验室动物如金黄地鼠(疑似感染田鼠巴贝虫)[119,121]或沙鼠(疑似感染分歧巴贝虫)[92,106]体内。这种接种实验在临床实验室经验较少，需在疾病预防控制中心或其他专业部门指导下进行。

(八)血清学试验

血清学试验可用于慢性巴贝虫病患者的诊断、献血者筛查和流行病学研究，不能用于急性巴贝虫病的诊断。田鼠巴贝虫抗体通常于发病后 2 周出现，并于感染数年后仍可检出[85]。间接免疫荧光法(IFA)[122-123]具有较高的敏感性(88%～96%)和特异性(90%～100%)[122]，是用于检测田鼠巴贝虫血清抗体的方法，其预制玻片在美国和欧洲有售，如 Bio Nuclear 诊断公司，Focus Diagnostics、Fuller Laboratories、Genoprice Gentaur 和 Invitech。间接免疫荧光法检测结果的解释是主观的，不同实验室有不同的判定阳性结果的终止滴度标准，通常情况下，设置于 1∶128～1∶256 的为高特异性的滴度标准[124]。如在患病早期采集血清，以及患者免疫功能低下或无脾症的情况下，抗体滴度可较低或为阴性；结缔组织病(如类风湿关节炎)患者可呈现假阳性。针对田鼠巴贝虫的间接免疫荧光实验在血清学上与邓肯巴贝虫、分歧巴贝虫和维氏巴贝虫抗体不存在明显的交叉反应[122]，因此，检测上述巴贝虫需要使用更敏感的方法[125-126]。

(九)结果的评价、解释和报告

使用任何一种诊断方法检测到巴贝虫都具有临床意义，检测结果应及时告知负责治疗的临床医生。血涂片检查结果最好能包括血中巴贝虫密度的估算。一次涂片检测阴性并不能排除巴贝虫

病诊断，即使血涂片检查阴性，报告也应加以说明。如患者有相应的临床指征更应建议连续涂片检查。

如果基层实验室无法鉴别诊断巴贝虫和疟原虫，则有必要告知临床医生已检出疟原虫或巴贝虫，同时将血样和(或)血涂片送至参比实验室或公共卫生实验室进一步分析。

参考文献请扫二维码查阅

第 140 章　利什曼原虫和锥虫

DAVID A. BRUCKNER, JAIME A. LABARCA

（马莹　译；胡媛、曹建平　审校）

利什曼原虫（*Leishmania* spp.）和锥虫（*Trypanosoma* spp.）有着共同的祖先，属于锥体科（Trypanosomatidae），锥体科位于真核生物古虫界超群（古虫界：盘脊下界：眼虫门：动基体纲：锥体目）[1,2]。这是一组单细胞生物，具有修饰的线粒体细胞器和单一鞭毛。

利什曼病大多是动物源性疾病，虫体为专性胞内寄生虫，通过受感染的雌性白蛉叮咬而传播给人。旧大陆利什曼原虫只有一个亚属，利什曼原虫亚属（*Leishmania*），而新大陆利什曼原虫，根据虫体在白蛉消化道（幽门周或幽门上）的发育分为两个亚属［利什曼原虫亚属和维阿尼虫亚属（*Viannia*）］。根据地理区域的不同，许多不同的虫种可感染人体，导致多种疾病（皮肤的、弥漫性皮肤的、皮肤黏膜的和内脏的疾病）（表 140-1）。

表 140-1　人体利什曼原虫感染特征

建议的亚属	目前的亚属和复合群	虫种	疾病类型[a]	推荐标本	地理分布
真利什曼亚属	利什曼亚属				
	硕大利什曼原虫复合群	硕大利什曼原虫（*L. major*）	CL	皮肤活检	阿富汗、苏联，以及非洲、中东地区
	热带利什曼原虫复合群	热带利什曼原虫（*L. tropica*）	CL	皮肤活检	阿富汗、印度、土耳其、苏联
		凯氏利什曼原虫（*L. killicki*）	CL	皮肤活检	阿尔及利亚、突尼斯
		埃塞俄比亚利什曼原虫（*L. aethiopica*）	CL，DCL，MCL	皮肤或黏膜活检	埃塞俄比亚、肯尼亚、苏联、也门
	墨西哥利什曼原虫复合群	亚马逊利什曼原虫（*L. amazonensis*）	CL，DCL	皮肤或黏膜活检	巴西、委内瑞拉
		盖氏利什曼原虫（*L. garnhami*）	CL	皮肤活检	委内瑞拉
		墨西哥利什曼原虫（*L. mexicana*）	CL，DCL，MCL	皮肤或黏膜活检	伯利兹城、危地马拉、墨西哥、得克萨斯州
		委内瑞拉利什曼原虫（*L. venezuelensis*）	CL	皮肤活检	委内瑞拉
		皮华诺利什曼原虫（*L. pifanoi*）	CL，DCL	皮肤或黏膜活检	巴西、委内瑞拉
		瓦氏利什曼原虫（*L. waltoni*）	CL，DCL	皮肤活检	中美洲和南美洲
	杜氏利什曼原虫复合群	阿氏利什曼原虫（*L. archibaldi*）	VL	组织[b]	旧大陆
		恰加斯利什曼原虫（*L. chagasi*）	VL	组织	新大陆
		杜氏利什曼原虫（*L. donovani*）	VL，CL，MCL，	组织	非洲、亚洲、南美洲

（续 表）

建议的亚属	目前的亚属和复合群	虫种	疾病类型[a]	推荐标本	地理分布
			DL	皮肤或黏膜活检	
		婴儿利什曼原虫(*L. infantum*)	VL	组织	旧大陆
	维阿尼虫亚属				
	巴西利什曼原虫复合群	巴西利什曼原虫(*L. braziliense*)	CL,MCL	皮肤或黏膜活检	中美洲和南美洲
		秘鲁利什曼原虫(*L. peruviana*)	CL	皮肤活检	哥伦比亚、哥斯达黎加、巴拿马
	圭亚那利什曼原虫复合群	圭亚那利什曼原虫(*L. guyanensis*)	CL,MCL	皮肤或黏膜活检	巴西、哥伦比亚、法属圭亚那、秘鲁
		巴拿马利什曼原虫(*L. panamensis*)	CL	皮肤活检	哥伦比亚、哥斯达黎加、秘鲁
		肖氏利什曼原虫(*L. shawii*)	CL	皮肤活检	巴西
		蓝氏利什曼原虫(*L. lainsoni*)	CL	皮肤活检	巴西
		奈氏利什曼原虫(*L. naffi*)	CL	皮肤活检	巴西、加勒比群岛
		林氏利什曼原虫(*L. lindenbergi*)	CL	皮肤活检	巴西
	豚鼠利什曼原虫复合群	马氏利什曼原虫(*L. martiniquensis*)	CL,DL,VL	皮肤活检 组织	加勒比群岛、泰国
		L. siamensis	CL	皮肤活检	泰国
拟什曼亚属		哥伦比亚利什曼原虫(*L. colombiensis*)	CL,VL	皮肤活检 组织	哥伦比亚、巴拿马、委内瑞拉

注：[a]CL. 皮肤利什曼病；DCL. 弥漫性皮肤利什曼病；DL. 弥漫性利什曼病；MCL. 皮肤黏膜利什曼病；VL. 内脏利什曼病。[b]骨髓、肝、淋巴结、脾

人体锥虫为寄生于人体宿主的血液和组织中的血鞭毛虫。美洲锥虫病(恰加斯病)是由克氏锥虫(*Trypanosoma cruzi*)所致，局限于美洲。让氏锥虫(*Trypanosoma rangeli*)属于裂锥虫亚属，可致无症状感染，且也只出现于美洲。非洲锥虫病(睡眠病或人体非洲锥虫病)是由属于锥虫亚属(*Trypanozoon*)的冈比亚布氏锥虫(*Trypanosoma brucei gambiense*)和罗德西亚布氏锥虫(*Trypanosoma brucei rhodesiense*)所致，局限于非洲中心地带。非洲的锥虫和让氏锥虫通过昆虫媒介分泌的唾液经叮咬的伤口直接传播，而克氏锥虫主要通过锥蝽粪便污染叮咬伤口及污染食物供应而导致传播(表140-2)。首例报道的人体锥虫病由伊氏锥虫(*Trypanosoma evansi*)引起，发现于印度[3]。

表 140-2 锥虫病的特征

特征	罗德西亚布氏锥虫	冈比亚布氏锥虫	克氏锥虫	让氏锥虫
媒介	舌蝇(采采蝇)	舌蝇(采采蝇)	猎蝽虫(锥蝽属，红猎蝽属，锥鼻虫属)	猎蝽虫(红猎蝽属)
主要保虫宿主	动物	人体	动物	动物
疾病	急性，<9 个月	慢性，数月至数年	急性，慢性	无症状
流行病学[a]	人畜共患病	人类传染病	人畜共患病	人畜共患病
诊断阶段	锥鞭毛体	锥鞭毛体	锥鞭毛体，无鞭毛体	锥鞭毛体
推荐标本	血液、脑脊液、硬下疳和淋巴结穿刺液	血液、脑脊液、硬下疳和淋巴结穿刺液	血液，美洲锥虫肿和淋巴结穿刺液	血液

注：[a]人畜共患病，通过人-动物-人的循环传播；人类传染病，通过人-人的循环传播

一、利什曼原虫

近期估计约有 3.5 亿人有感染利什曼病的风险，每年 70 万～100 万新发病例[4]。经常发现利什曼原虫的新种。利什曼病的分类仍有争议，还在不停地调整。目前，虫种的鉴定依赖于分子技术而非地理分布和临床表现[5-7]。用于鉴定至种水平的分子技术包括染色体和动基体 DNA 的 PCR 扩增，DNA 包括特定的蛋白编码基因[6,8]。诊断上，很多实验室仍然依赖于标本的地理分布及临床鉴定（表 140-1）。

(一)生活史和形态

利什曼原虫在它的生活史中有两个不同的阶段，无鞭毛体和前鞭毛体（图 140-1；完整生活史见 www.cdc.gov/dpdx/index.html）。无鞭毛体期（利杜体）寄生于哺乳动物宿主的网状内皮细胞。无鞭毛体呈小的卵圆形，大小为 3～5 μm，含有一个大的胞核和一个小的动基体（图 140-1 和图 140-2）。在理想的显微镜状况下，也可以观察到副基体。无鞭毛体在宿主的网状内皮细胞内进行增殖。

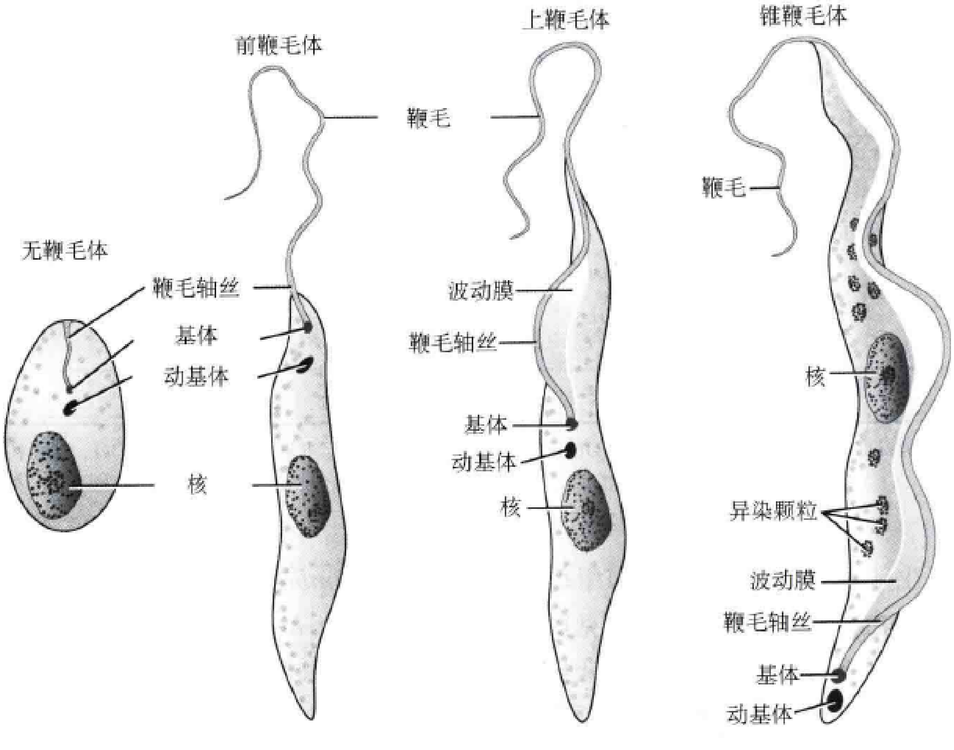


图 140-1 利什曼原虫和锥虫见于人类和昆虫宿主的生活史阶段，见彩插

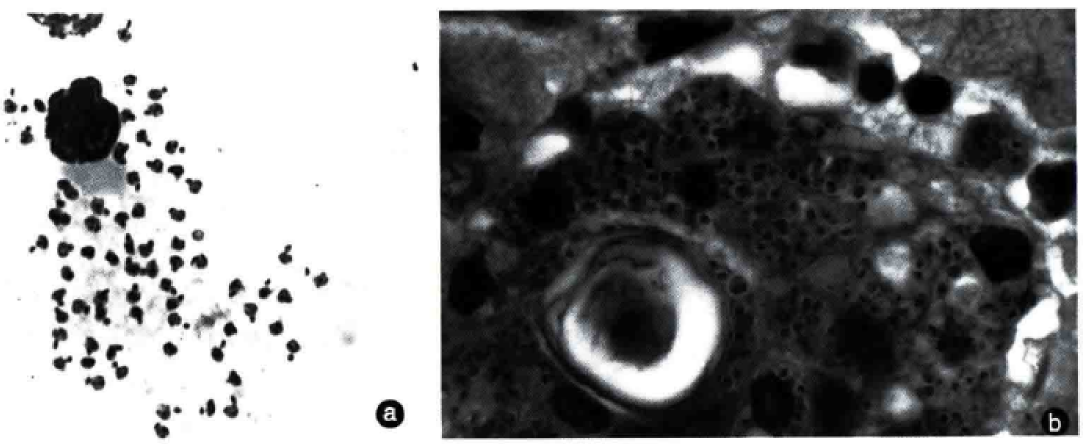


图 140-2 a. 杜氏利什曼原虫无鞭毛体，脾印片（吉姆萨染色）；b. 肝中的杜氏利什曼原虫（苏木素-伊红染色），见彩插

当昆虫媒介(白蛉)吸血时,无鞭毛体进入白蛉体内,转变为前鞭毛体(图 140-3)。前鞭毛体在白蛉的肠中繁殖,转变为循环后期前鞭毛体,并移行至口下板,当白蛉再次吸血时,虫体从口下板被释放出来。在白蛉体内的整个生活史需 4～18 天。当前鞭毛体接种入叮咬部位,被组织巨噬细胞吞噬后,前鞭毛体转变为无鞭毛体。这一形态的改变有助于击败宿主的免疫应答。寄生虫表面分子的改变在巨噬细胞吸附和逃避宿主的免疫应答包括影响巨噬细胞的信号通路上扮演着重要角色。

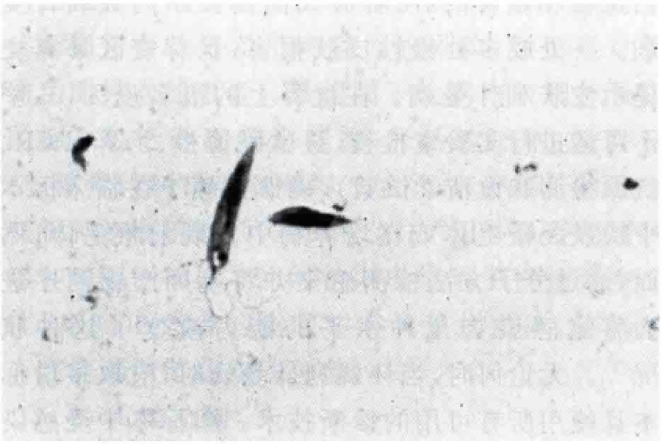


图 140-3 杜氏利什曼原虫前鞭毛体(吉姆萨染色),见彩插

对于皮肤、皮肤黏膜和内脏利什曼病,利什曼原虫的生活史都是相似的,只是在内脏利什曼病中,受染网状内皮细胞可以遍及全身。

(二)流行和传播

在旧大陆和新大陆,传播利什曼病的雌性白蛉成虫分属于白蛉属和罗蛉属。30 多种白蛉可传播利什曼病。这种疾病被认为主要是一种动物源性疾病,有自然的保虫宿主,包括啮齿类动物、负鼠、食蚁兽、树獭和犬。在世界的某些疫区,感染的传播可通过人-媒介-人的循环。感染也可通过与受感染病变处的直接接触或通过螫蝇或犬蝇(厩螫蝇)的叮咬机械性传播。如果蝇的吸血被打断,它会找另一宿主重新开始吸血,它能将部分前次吸的血混合唾液反刍至叮咬部位,由此感染宿主。66%以上的人体新发皮肤利什曼病病例发生于阿富汗、阿尔及利亚、巴西、哥伦比亚、伊朗和叙利亚[4]。得克萨斯州和俄克拉荷马州已有地方性人体感染的报道[8]。大多数皮肤黏膜利什曼病的诊断病例来自玻利维亚、巴西、埃塞俄比亚和秘鲁[4]。

内脏利什曼病可以是地方性、流行性或散发性疾病。它是一种动物源性疾病,但在印度和巴西,黑热病为人类传染病[9-10]。关于自然保虫宿主,杜氏利曼原虫(*Leishmania donovani*)有犬科的野生成员和各种啮齿类动物,婴儿利什曼原虫(*Leishmania infantum*)有犬、其他犬科动物和鼠,美洲的恰加斯利什曼原虫(*Leishmania chagasi*)有犬科成员和猫。黑热病后皮肤利什曼病(PKDL)患者可能是流行间隔时期维持感染非常重要的保虫宿主。90%以上的内脏利什曼病病例集中于巴西、埃塞俄比亚、印度、肯尼亚、索马里和苏丹[4]。孟加拉国、印度和尼泊尔已经制定了黑热病消除计划,目标日期为 2020 年[9-10]。

(三)临床表现

根据所涉及的虫种不同,感染利什曼原虫可导致皮肤、弥漫性皮肤、皮肤黏膜或内脏疾病(表 140-1)。疾病有各种不同的表现,这使临床疾病的分型令人困惑[6,11]。在流行地区常见利什曼原虫和人类免疫缺陷病毒(HIV)的合并感染。对于一直处于严重免疫功能低下状态的合并感染患者,大约 1/4 会在诊断利什曼病的第一周内死亡。利什曼原虫感染表现得像机会感染,在非典型部位会发现虫体。高效抗逆转录病毒疗法的使用已显著改善了 HIV 感染合并内脏利什曼病患者的预后[11-12]。抗逆转录病毒疗法和利什曼病的治疗可以同时进行,但是,必须密切监测患者的免疫重建炎症综合征和药物毒性增加的情况[11]。

皮肤利什曼病的首发症状是在昆虫叮咬部位或附近出现一个质硬、无痛性丘疹[13]。潜伏期可短至 2 周[硕大利什曼原虫(*Leishmania major*)]或长达数月至 3 年[热带利什曼原虫(*L. tropica*)和埃塞俄比亚利什曼原虫(*L. aethiopica*)]。丘疹可以有剧烈瘙痒,并会长至直径 2 cm 或更大。皮肤损害可以在数天或数周内从简单的丘疹或红斑发展至结节和溃疡。在单纯的皮肤利什曼病,感染局限于昆虫叮咬部位,并在此处发生自限性的肉芽肿反应。皮肤损害曾被误认为基底细胞癌、热带脓皮病、孢子丝菌病和皮肤分枝杆菌感染。皮肤损害可随着时间(数月至数年)自

然愈合，有可能留下残余瘢痕。应关注患者卫星病灶和淋巴传播的发生，并对发生皮肤黏膜利什曼病的潜在风险进行评估，在此期间建议进行药物治疗[11]。发生淋巴扩散或皮肤黏膜利什曼病的倾向取决于患者的免疫功能和获得感染的地理区域(表 140-1)。

皮肤黏膜利什曼病最常由巴西利什曼原虫(*Leishmania braziliensis*)复合群所致。开始时原发病变可能与皮肤利什曼病相似。慢性鼻充血和分泌物是皮肤黏膜利什曼病的主要表现。随着感染的进展，口、腭、咽和喉也可能被累及。在多达80%的病例中，未经治疗的原发损害可发展至皮肤黏膜型。鼻或口腔黏膜的转移性播散可发生于活动性原发损害还存在时或原发损害治愈多年后。黏膜损害不会自愈，常会发生继发的细菌感染，并可能致命。有少数杜氏利什曼原虫和埃塞俄比亚利什曼原虫引起皮肤黏膜利什曼病病例的报道。鉴别诊断包括淋巴瘤、中线肉芽肿、韦格纳肉芽肿、副球孢子菌病、组织胞浆菌病、皮肤分枝杆菌感染、梅毒和麻风。

内脏利什曼病的临床特征不尽相同，从无症状、自行消退的感染到明显的内脏利什曼病。潜伏期可短至 10 天，长至两年；通常为 2～4 个月之内。常见的症状包括发热、厌食、乏力、体重减轻，常有腹泻。在感染了 HIV 的人群中，内脏利什曼病是一个重要的机会感染。伴发的 HIV 感染显著增加了从无症状感染发展为活动性内脏利什曼病的风险[12]。合并感染 HIV 的患者可以不表现免疫功能正常的患者所常见症状。常见临床表现包括无触痛的肝、脾、淋巴结肿大和偶尔的急性腹痛；面部、手、足和腹部皮肤变黑(黑热病)常见于印度的浅肤色人。贫血、恶病质和显著的肝脾肿大显示疾病加剧。数周后可能发生死亡，慢性患者可能在 2～3 年后死亡。大多数感染者无症状或仅有极少或轻微的症状，未经治疗症状可消退。从 1990 年开始，器官移植受者的利什曼病明显增加。在报道的器官移植受者病例中，大多数为内脏利什曼病，很小一部分为皮肤黏膜利什曼病，皮肤利什曼病罕见[14]。急性期的鉴别诊断包括阿米巴肝脓肿、恰加斯病、疟疾、伤寒、斑疹伤寒和裂体吸虫病。亚急性或慢性疾病与营养不良、菌血症、布鲁菌病、组织胞浆菌病、白血病、淋巴瘤、疟疾、单核细胞增多症和裂体吸虫病易混淆。

皮肤利什曼病或 PKDL 见于印度和苏丹一些内脏利什曼病未治愈的患者。PKDL 常发生于治疗结束后的 6 个月或更晚。这种综合征在拉丁美洲很罕见，但有报道出现于合并感染 HIV 的患者。斑疹状或色素减退的皮肤损害与少量寄生虫相关，而红斑状和结节状损害与大量虫体有关。这种情况必须与麻风、梅毒和雅司病相鉴别。

(四)诊断

在疫区可以通过临床表现进行诊断。持续发热、进行性的体重下降、贫血、白细胞减少、高球蛋白血症和显著的肝、脾肿大高度提示内脏利什曼病。一处或多处慢性皮肤损害，且有疫区暴露史提示皮肤利什曼病。在世界上的很多疫区，几乎不可能进行实验室检查(显微镜镜检、培养、PCR、抗原检测和血清学试验)，确诊依赖于在临床标本中检获无鞭毛体或在培养物中发现前鞭毛体；然而，通过分子方法检测感染并将基因产物测序进而鉴定感染物至种水平的能力改变了这种状况[8]。无论何时，当怀疑利什曼病时，应取多份标本且使用所有可用的诊断技术。当标本中受感染细胞的数量少时(巴西利什曼原虫复合群感染)，也许仅一种方法可成功检测到感染的发生，而其余的方法均为阴性。

1. 标本的采集 所有的皮损处应使用 70% 的乙醇彻底清洁，外部残渣(焦痂和分泌物)应去除。清创术后可用手术刀片刮擦溃疡底部获得分泌物用于制备涂片、培养或核酸扩增试验(NAAT)，与此同时采取防止出血的预防措施。标本可采集自病变部位的边缘，通过抽吸、刮取、钻取活检或用手术刀片做一个切口的方式获得。从切口壁刮取的材料应做若干张涂片。多种标本可通过 NAAT 方法用于利什曼病诊断[15-17]。NAAT 已显示出较直接镜检、组织病理学和培养更敏感，但此方法常常限于大型医院或诊所。NAAT 方法还未标准化，尚未进行多中心研究来验证这些方法[6,15-17]。实验室工作人员可能会想和地方、州或国家公共健康实验室或者美国疾病预防控制中心(CDC)联系以获得诊断的信息及在标本选择和可用实验方面获得帮助。CDC 网站 https://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/resources/pdf/cdc_diagnosis_guide_leishmaniasis_2016.pdf 上有一个利什曼病实验室诊断的实

用指南。强烈建议实验室不依赖于单一诊断方法,而是使用多种诊断方法(培养、直接镜检、组织学、NAAT 及可用的血清学试验)。

取活检标本中间的组织在玻片上制备印片。组织的中心部分应同时做病理组织学检测。组织切片中无鞭毛体的识别较涂片或印片更加困难。这是由于虫体在细胞内聚集,显得更小,并且在不同的角度被切断。细针穿刺也可使用含有无菌无防腐剂的缓冲盐水(0.1 ml)和 26 号针头的无菌注射器来完成。针头刺入病变部位外缘下,针头旋转数次,组织液被吸入针头。对于内脏利什曼病通过脾穿刺获得的组织标本其阳性率最高,但这一操作会给患者带来较大的风险,特别是对凝血功能异常的患者。其他用于检测内脏利什曼病的标本包括淋巴结穿刺物、肝活检标本、胸骨穿刺、髂骨骨髓标本和静脉血血沉棕黄层。曾在支气管肺泡灌洗液、胸腔积液、HIV 阳性患者的胃肠道和口腔活检标本的网状内皮细胞中检获无鞭毛体。PKDL 患者的皮肤中有大量的虫体,特别是有红斑和结节病变的患者。

2. 直接检测

(1)显微镜镜检:无鞭毛体期见于巨噬细胞内或破碎细胞附近(图 140-2)。这个阶段可通过其形状、大小、染色特征,特别是胞质内有一个动基体进行识别。吉姆萨染色将胞质染成浅蓝色,胞核和动基体染成红色或紫色。由于过碘酸-希夫、黏蛋白卡红和六胺银染均无法将无鞭毛体染成阳性,故苏木素和伊红染色的组织切片中检测到的无鞭毛体可与细胞内真菌相区别。细胞内真菌无动基体而无鞭毛体有动基体。在组织切片中的无鞭毛体识别更困难,这是由于在适当制备的组织切片或涂片中可以观察到整个虫体。敏感性为 15%~70%[18]。

(2)核酸检测:检测利什曼原虫 DNA 或 RNA 的分子技术已用于诊断、预后和种株鉴定[18]。大部分分子诊断试验是实验室建立的试验。FDA 已批准 SMART Leish PCR 用于检测皮肤利什曼病(Cepheid, Sunnyvale, CA)。这些方法被认为较玻片检查或培养更敏感,特别是对培养困难的皮肤黏膜利什曼病的病原体检测[6,15-17,19-20]。总的来说,位于皮肤黏膜损害处的病原体很少并难以通过镜检的方法检获。因为由利什曼原虫维阿尼虫亚属所致的感染被认为侵袭力更强并更有可能导致治疗失败,所以将病原体鉴定至种和株水平的分子技术对治疗显得尤为重要。多位点酶切电泳和多位点序列分型已用于利什曼原虫种和株的鉴定,但这依赖于有可培养的分离株,并且在某些病例中,这些方法不具有足够的分辨力。为提高分离株的鉴定,各种 rRNA 和 DNA 目的片段,如微小外显子或剪接前导序列,rRNA 内转录间隔区(ITS),7SL RNA 基因,热休克蛋白 70 基因和细胞色素 b 基因已使用。动基体 DNA 是好的靶标,因为每个生物体有超过 10 000 个拷贝,因此增加了检测到的可能性;然而,动基体 DNA 微环的异质性是一个问题[8]。由于目的序列内存在基因多态性,故使用多个目的片段是有必要的[6,8,18]。敏感性取决于所使用的方法,从 80%到 100%不等[18]。CDC 可以提供分子诊断检测(https://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/index.html),故标本采集前应咨询 CDC。

(3)培养:如果材料要用于培养,则必须无菌采集。培养前应将组织匀浆。成功用于利什曼原虫培养的培养基包括诺-麦-尼三氏培养基(NNN)及含 30%胎牛血清的 Schneider 果蝇培养基[21]。25℃培养的培养物在前 2 周应每周检查 2 次,之后每周检查 1 次,至 4 周后方可报告培养为阴性。显微镜下可发现湿片中的前鞭毛体,然后吉姆萨染色观察其形态。大多数实验室不提供培养;然而,获得分离株以进行种株鉴定和获取药敏信息具有重要意义。敏感性从 44%到 58%不等,皮肤黏膜利什曼病病例最难培养成功[18]。CDC 可以为标本培养提供运输服务(https://www.cdc.gov/parites/leishmania/index.html),故标本采集前应咨询 CDC。

(4)动物接种:可将患者的标本接种至动物如金地鼠。皮肤和皮肤黏膜利什曼病通过鼻内接种动物,而内脏利什曼病采用腹膜内接种。使动物感染上利什曼原虫可能需要 2~3 个月。为使感染的实验室诊断达到最优化,可能需要同时进行组织涂片、PCR(如果可行)、培养和动物接种。如今的法规和财务成本使这种诊断方法已经不再实用。敏感性从 44%到 52%不等[18]。

3. 皮试 利什曼素(Montenegro)试验(美国和加拿大不提供该检测)是一种迟发型超敏反应,对人群的流行病学调查有重要意义,能识别处于感染风险的群体。疫区的诊所和研究机构也许可

以进行这个试验。虫荷量越大，患者感染的时间越长，皮试阳性的可能性越大。虽然在美国以外可获得商业化的皮试抗原，但缺乏产品的标准化和稳定性。阳性反应常见于皮肤和皮肤黏膜利什曼病，但活动性内脏利什曼病和弥漫性皮肤利什曼病患者可呈现阴性反应。黑热病患者也可呈现阴性反应。这个试验对内脏利什曼病的诊断没有价值。对皮肤利什曼病，敏感性从82%到89%不等，对皮肤黏膜和弥漫性皮肤利什曼病患者，敏感性可达100%[18]。

4. 血清学及抗原试验 有可用的血清学试验，然而它们对于皮肤黏膜和内脏利什曼病的诊断不是很有用。在黑热病中，γ-球蛋白、免疫球蛋白G(IgG)和IgM均显著增高。在疫区用作筛选试验的乙醛或甲醛凝胶试验即以此为基础[22]。在1 ml血清中加入1滴福尔马林以促进免疫球蛋白的沉淀。已开发了很多血清学试验用于诊断，包括间接荧光抗体试验(IFA)、酶联免疫吸附试验(ELISA)和免疫印迹试验，但是这些试验在疫区以外的地方并非广泛可行[8,18,23-24]。根据方法、所用抗原及所检测的利什曼原虫种类的不同，敏感性从28%到93%不等[18,24]。

采用婴儿利什曼原虫/恰加斯利什曼原虫重组k39抗原，用ELISA、试纸检测及快速免疫层析试纸条在诊断免疫功能正常人群的内脏利什曼病时敏感性从37%到100%不等[18]。合并感染HIV的内脏利什曼病患者可能无法检出抗利什曼原虫抗体[12]。一些参考实验室和CDC可进行血清学实验。

尿抗原的检测已用于内脏利什曼病的诊断，其敏感性从41%到86%不等[8,18,24-25]。

(五)治疗和预防

单纯皮肤利什曼病的损害多能自愈。可选的治疗法包括冷冻疗法、热疗、光动力疗法、手术切除病变和化疗[11]。化疗药物包括唑类(氟康唑、酮康唑、泊沙康唑)、两性霉素B、米替福新、巴龙霉素、五价锑剂和喷他脒[11]。FDA已批准米替福新用于治疗皮肤利什曼病。提倡治疗是为了减少面部重要部位瘢痕的形成及预防感染的播散和(或)复发。虽然并不知道皮肤利什曼病的最佳治疗方案，但在疫区的治疗可以包括注射锑剂。皮损数量少(3处或更少)的患者可给予病灶内锑剂治疗，对更弥散的感染应给予肌内注射疗法或静脉注射疗法。皮肤黏膜感染不应提倡局部治疗。对治疗的反应因利什曼原虫虫种和疾病类型而异[11,26]。巴西利什曼原虫感染具有慢性、潜伏性和转移性的特点，有巴西利什曼原虫感染患者在治疗后11年仍被发现PCR检测为阳性[27]。治疗可为个性化，可以包括五价锑剂、两性霉素B脂质体和米替福新，这些药物可以联合使用。

内脏利什曼病若不治疗可致患者死亡，合并感染HIV的患者必须积极治疗[11]。此外，个别人可能不得不终身治疗以预防内脏利什曼病的复发。治疗内脏利什曼病最常用的药物包括两性霉素B、米替福新、巴龙霉素和五价锑剂(葡萄糖酸锑钠、锑酸葡甲胺)。两性霉素B(FDA已批准用于内脏利什曼病)脂质体疗效最好，而在印度和尼泊尔对锑剂耐药已常见。米替福新是一个有效的口服药物，尽管有报道治疗失败率高达30%[26]。

如果患者在临床上没有好转，治疗后1～2周应继续进行涂片和培养。PCR检测也可用于监测治疗的进展，但没有监测的标准，并且也不用于常规随访[11,26,28]。

在利什曼病的疫区，疫苗接种仍然是消除利什曼病的主要措施。将自然获得的皮肤利什曼患者病灶处浆液性渗出物接种至未免疫人群身体的不显眼部位，预防是有效的，但疫苗对其他类型的利什曼病不起作用。由于皮肤黏膜利什曼病感染涉及广泛的病理改变，绝不能尝试用来自皮肤黏膜利什曼病患者的渗出物进行接种。其他可能的预防方法包括住所喷洒杀虫剂，在皮肤上涂抹昆虫驱避剂、穿保护衣和使用细网格的蚊帐。虽然在犬可能作为保虫宿主的区域，拟除虫菊酯浸泡项圈被用于预防感染，但在大多数地方，保虫宿主的控制并不成功。应告诫有病灶的感染者要保护病灶防止昆虫叮咬，还应向患者宣传关于自体接种和感染可能性的知识。

二、美洲锥虫病

(一)克氏锥虫

美洲锥虫病(恰加斯病)是由克氏锥虫所致的动物源性疾病，主要见于拉丁美洲。21个美洲国家中6500万人有感染的风险，每年28 000例新发病例[29-30]。60%以上的恰加斯病病例发生于阿根

廷、巴西和墨西哥。患者可表现为急性或慢性疾病。恰加斯病被认为是一种农村地区的疾病，然而由于社会模式的改变这种疾病现在已随处可见，包括从农村到城市的迁移，受染者迁移到一般不怀疑有恰加斯病的区域。主要是通过媒介叮咬传播，但由媒介通过粪便污染食物供给也是一个重要的感染来源。传播可以发生在子宫内，当受染的母亲迁移到非疫区时就会造成诊断上的问题。通过输血和器官移植染病是一个非常严重的问题[31-32]。很多血清学阳性的患者可一直没有症状[30,33]。

1. 生活史和形态 当猎蝽（锥蝽、吻锥蝽或吸血锥蝽）吸血时，锥鞭毛体（图140-4和图140-5）被其摄入。锥鞭毛体转变为上鞭毛体（图140-1、图140-4和图140-5），在中肠后部繁殖。8～10天后，从上鞭毛体发育为循环后期锥鞭毛体。这些随猎蝽粪便排出的循环后期锥鞭毛体是人体的感染阶段（完整生活史见 www.cdc.gov/dpdx/index.html）。在疫区由输血或血液制品导致的传播要尤其关注，可采用血清学试验对供血者进行筛查。而在非流行区，已采用问卷的方法推迟来自疫区的准献血者献血。献血单位通过FDA批准的试验（Abbott Prism Chagas 和 T. Cruzi ELISA）常规筛查恰加斯病抗体。来自实体器官捐献者的传播和从孕妇到胎儿的垂直传播也可发生。当食物被病媒粪便污染时，亦会发生食源性爆发。

猎蝽边吸血边排便，粪便中的循环后期锥鞭毛体通过摩擦或刮擦进入叮咬伤口或位于黏膜表面，从而使人体感染恰加斯病。在人体内，克氏锥虫有2种形态，无鞭毛体和锥鞭毛体（图140-1、图140-4和图140-6）。锥鞭毛体期见于血液中，感染宿主任何有核细胞，但在骨骼肌和心肌中优先转变为无鞭毛体。无鞭毛体期在细胞内繁殖，最终破坏细胞，无鞭毛体和锥鞭毛体均被释放入血。

锥鞭毛体呈纺锤形，长约20 μm；在染色血涂片上呈现特征性的"C"或"U"形（图140-4）。血中出现的锥鞭毛体有2种形式：细长型和短粗型。短粗型被认为是传播媒介的感染阶段。胞核位于虫体的中心，虫体后端有一个大的、卵圆形动基体。一根鞭毛从基体发出，沿波动膜的外缘延伸至虫体前端，在此伸出为游离鞭毛。吉姆萨染色时，锥鞭毛体的胞质染成蓝色，胞核、动基体和鞭毛染成红色或紫色。

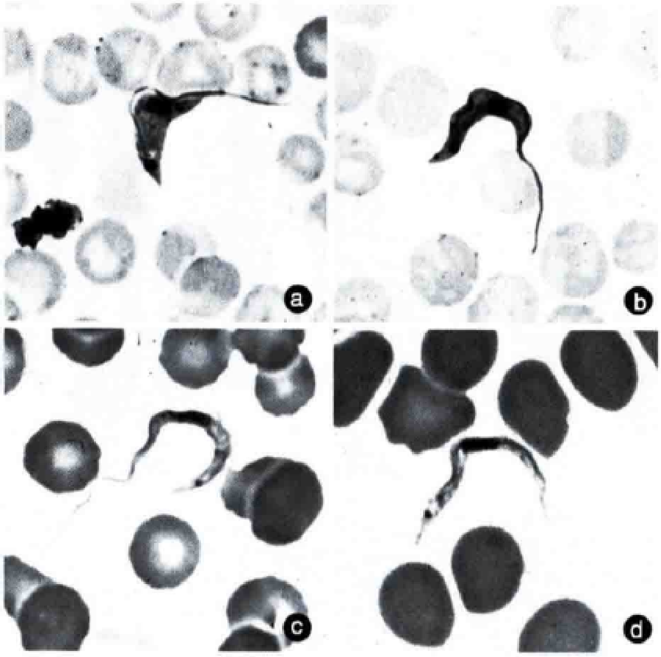


图140-4 a，b. 克氏锥虫锥鞭毛体；c，d. 冈比亚布氏锥虫锥鞭毛体，见彩插

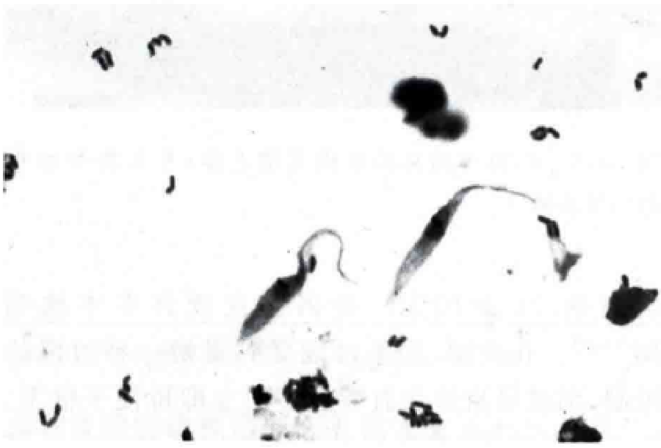


图140-5 克氏锥虫上鞭毛体（吉姆萨染色），见彩插

无鞭毛体（直径2～6 μm）难以和利什曼原虫的无鞭毛体区分。它含有一个大的胞核和一个杆状的动基体，吉姆萨染色染成红色或紫色，胞质染成蓝色。

2. 流行和传播 恰加斯病是发生于整个美洲的动物源性疾病，包括中美洲和南美洲及美国的加利福尼亚、路易斯安那和得克萨斯[30,34]。它涉及与保虫宿主（犬、猫、犰狳、负鼠、浣熊和啮齿类动物）关系密切的猎蝽。人类感染主要发生于卫生和社会经济条件较差的农村地区，糟糕的居住条件给猎蝽提供了绝佳的滋生地。恰加斯病见于

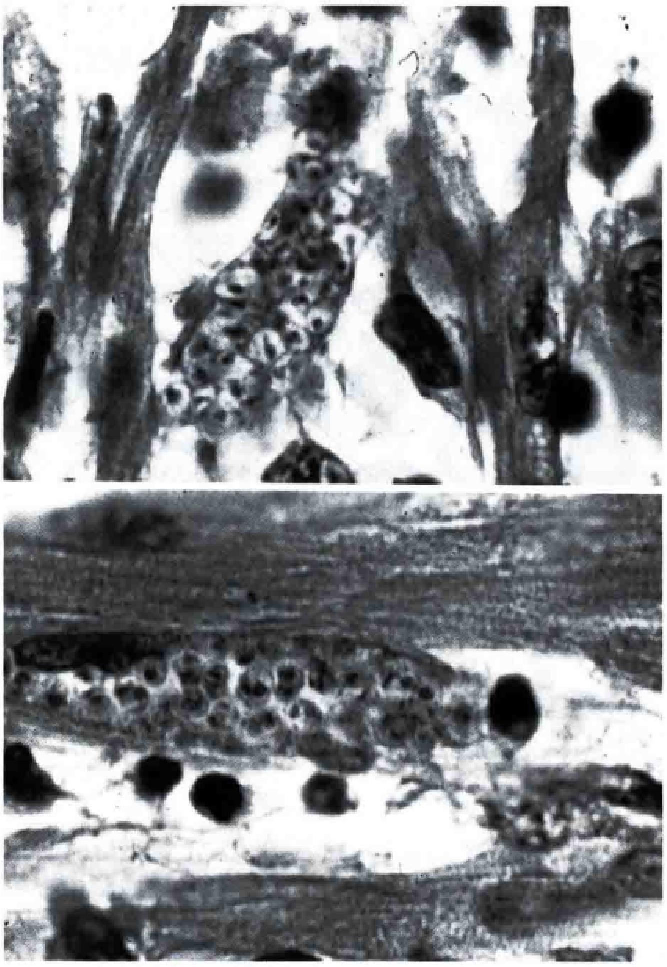


图 140-6 心肌中的克氏锥虫无鞭毛体(苏木素-伊红染色),见彩插

美洲的 21 个国家。美国已发现许多本地病例[34-36]。在美国,感染可能受到猎蝽一种习惯的限制,那就是猎蝽在血餐后不会立即排便于宿主。由于人口流动(受染的患者从疫区迁移),感染可在非疫区的许多地区发现,如西班牙和日本,在这些地区,医生在其鉴别诊断时可能不会考虑这种感染。

该疾病的分布已进入 2 个生态区:南部锥形地区(南美洲),在那里猎蝽媒介生活在人的家中;和北部锥形地区(中美洲和墨西哥),那里猎蝽生活于屋内和屋外。克氏锥虫不同株在对潜在媒介的传染性、抗原性、组织趋向性、致病力和对治疗的反应方面有很大差异[32]。基于分子流行病学,克氏锥虫已可划分为 6 个基因型或独立的分型单元(TcⅠ 至 TcⅥ)[37]。南部锥形地区大多数人的感染是由 TcⅡ 型所致,而在北部锥形地区 TcⅠ 占优势。

3. 临床表现 除了通过昆虫叮咬伤口或黏膜暴露而致克氏锥虫感染,还可通过输血、胎盘传递、器官移植及误食含有受染猎蝽或其粪便的食物或饮料导致感染[31]。大部分先天性感染并无症状。感染部位会发生局部的炎症反应,伴有恰加斯肿(红斑状皮下结节)或 Romaña 征(眼睑水肿和结膜炎)。

暴露后潜伏期常为 1～2 周。大多数患者有非特异性症状或根本没有症状。急性全身症状发生于感染的 2～3 周,以高热、肝脾大、肌痛、红斑状皮疹、急性心肌炎、淋巴结肿大及睑、腿和足的皮下水肿为特征。免疫抑制患者在恰加斯病的急性期表现为急性心肌炎或急性脑炎,病死率高。大多数急性病例从未被发现并在 2～3 个月后症状消退进入无症状的慢性期(未定期或临床潜伏期),除非进行治疗,否则这些患者将终身保持受染状态。约 70%的慢性恰加斯感染患者没有症状(未定期),然而他们仍然能传播感染。其余 30%慢性恰加斯病患者会发生心肌炎或与消化道失神经支配相关的症状[30]。未被检测到的感染发生后或在诊断为急性恰加斯病后,慢性恰加斯病的体征可以发展数年或数十年。慢性恰加斯病最常见的临床体征表现为心脏扩大和传导改变的心肌病。经口(食源性)感染的患者心肌炎发病率和死亡率更高。一些患者更可能发展至巨食管症或巨结肠症。胃肠道恰加斯病在阿根廷、玻利维亚、巴西、智利和巴拉圭(南锥体国家)以外的地区很少见。"巨型"情况的发生和神经节细胞被破坏有关,导致肠道动力障碍,引起巨食管症患者吞咽困难、误吸和反流及巨结肠患者的严重便秘。在慢性恰加斯病中,组织破坏除了是由寄生虫引起外,自身免疫也有作用。对于 HIV 阳性患者,恰加斯病的复发常引发超高原虫血症,复发也可发生于其他免疫抑制的患者[30]。很少见到中枢神经系统(CNS)受累,但在合并感染了 HIV 的个体,常发现中枢神经系统被累及,有报道描述这些患者发生了急性致命的脑膜脑炎和肉芽肿性脑炎。

疾病的急性期和慢性期均可发生母亲至胎儿的先天性传播。先天性感染可导致流产、早产、神经缺损和智力障碍[38-39]。血清学阳性母亲产下的婴儿应进行监测至 1 岁以排除感染。移植来自血清学阳性供者的实体器官或其他组织导致感染的传播已成为一个严重的问题[30]。虽然移植来自血清学阳性供者的任何器官或组织都应被视为具感

染性，但感染传播的风险依赖于其他的因素。一些受者并未发生感染，但应连续监测所有人是否有感染的症状。

4. 诊断 在工作中会接触到来自疑似恰加斯病患者标本的医务人员，应根据血液-骨髓病原体指南遵循通用预防措施。锥鞭毛体具有高度传染性。伴有免疫抑制（即 HIV 感染者和接受器官移植的患者）的慢性恰加斯病患者应在开始的几个月每周监测，之后每月监测直至 1 年或更久以防感染的复发。

（1）标本采集：确诊依赖于检获血液中的锥鞭毛体，组织中的无鞭毛体，或者 PCR 和血清学试验阳性（表 140-3）。恰加斯肿和肿大淋巴结的穿刺物可检查无鞭毛体和锥鞭毛体。还可做活检标本的组织学检查。急性病期间易在血液中发现锥鞭毛体，但在慢性病期间，除了发热时，其他时候锥鞭毛体罕见或没有。锥鞭毛体在发热时血液中的浓度是最高的。感染后约 10 天血液中出现锥鞭毛体，且持续整个急性期。实验室工作人员可能希望与当地、州或国家公共健康实验室或者 CDC 联系，以获得诊断的信息，以及在标本选择和可用实验方面获得帮助（www. cdc. gov/parasites/chagas/health_professionals/index. html）。

表 140-3 恰加斯感染的诊断方法

方法[a]	在感染阶段使用		
	急性	不确定	慢性
直接法			
直接镜检	+	−	−
厚血膜和薄血膜	+	−	−
PCR	+	+	+
血培养	+	−	−
动物接种诊断法	+	+	+
间接法			
IFA(IgM 和 IgG)	+	+	+
EIA	−	+	+
IHA	−	+	+
RIPA/WB	−	+	+

注[a] IFA. 间接荧光抗体试验；EIA. 酶联免疫试验；IHA. 间接血凝试验；RIPA. 放射免疫沉淀试验；WB. 免疫印迹试验

（2）直接检测

1）显微镜镜检：锥鞭毛体可自血液湿片中检获，或使用薄血膜和厚血膜或血沉棕黄层浓缩技术[21,40]。厚血膜法下一个小得多的视野所用的血量几乎和薄血涂片法的血量相当，以此将诊断阶段虫体进行浓集。微量血细胞比容法使用 2～3 倍的血量并将锥鞭毛体浓集入血沉降率棕黄层。无鞭毛体和锥鞭毛体均可选择吉姆萨染色。无鞭毛体在苏木素和伊红染色的组织中容易看到，过碘酸-希夫、黏蛋白卡红和六胺银染均无法将无鞭毛体染成阳性，这点可以将其与真菌（组织胞浆菌）相鉴别。无鞭毛体主要在骨骼肌和心肌细胞中检获。在有黑热病发生的地区，因无鞭毛体形态相似，杜氏利什曼原虫和克氏锥虫感染必须通过 PCR、免疫检测、培养（克氏锥虫为上鞭毛体而杜氏利什曼原虫为前鞭毛体）、血清学试验、动物接种或动物接种诊断法等技术来进行区分[30,32]。包括居住史和（或）旅行史在内的病史，以及在横纹肌中而非网状内皮组织中有确认的病原体可作为克氏锥虫而非杜氏利什曼原虫感染的强有力证据。

2）核酸检测：虽然是仅在专门的中心可进行的非常规检测，NAAT（未经 FDA 批准）已可检测 20 ml 血中低至 1 个锥鞭毛体，并在治疗随访方面发挥了重要作用[34-37,,39,41-42]。该方法无法对感染不确定期和慢性期患者进行诊断识别[43]。为了提高对阳性患者的识别，提倡使用多基因靶点的实时定量荧光 PCR。由于目的基因存在多态性，故需要检测多个目的基因。以 PCR 为基础的方法尚未标准化，尚未进行多中心研究来验证这些方法。许多 NAAT 将动基体 DNA 作为主要靶标，是由于每个虫体有多拷贝数的动基体 DNA，从而

增加了感染检出的机会。几乎没有研究对各种用于诊断的PCR方法进行比较，因为大多数为实验室开发的试验。

3)培养和动物接种：抽吸物、血液和组织均可用于培养。选用NNN培养基[21]。25℃培养的培养物在前2周应每周检查2次，之后每周检查1次，直至4周后方可报告培养为阴性。如果可以，可接种实验动物(大鼠或小鼠)，观察血液中的锥鞭毛体或进行PCR检测。

4)动物接种诊断法：在疫区动物接种诊断法用于临床恰加斯病的诊断较过去更少。其他诊断方法如分子检测已被证实更有用。让未感染锥虫的锥蝽吸食疑似恰加斯病患者的血液，3个月后，取锥蝽粪便、血淋巴、后肠和唾液腺，显微镜镜检是否存在带有鞭毛的虫体形态，或者可使用PCR法来检测受染锥蝽，并提供快速诊断。不到50%的血清学阳性患者的动物接种法为阳性。有些患者可能对锥蝽的唾液分泌物产生严重的过敏反应。

(3)血清学试验：血清学试验主要用于检测不确定期和慢性感染[43]。当直接镜检和PCR检测为阴性时，为了检测由寄生虫垂直传播引起的先天性感染，应在出生后9～12个月[38]进行血清学检查。这样可减少被动转移的母体抗体的影响。许多先天性锥虫感染是无症状的，直到后来慢性后遗症表现出来。

采用血液和唾液来诊断恰加斯病的血清学试验包括补体结合试验(Guerreiro-Machado试验)，化学发光试验、IFA、间接血凝试验和ELISA[30,32,38,44]。大多数试验使用一种上鞭毛体抗原，交叉反应见于让氏锥虫、利什曼原虫、刚地弓形虫感染和肝炎的患者。合成多肽和重组抗原的使用提高了免疫诊断技术的敏感性和特异性。采用寄生虫溶解产物和重组抗原的数种诊断性酶免疫试验和免疫层析法已被FDA批准用于筛查献血者和患者。FDA和美国血库协会要求对捐献的血液进行恰加斯抗体筛查，并建议器官分享联合网络检测组织供者的恰加斯抗体。由于缺乏敏感性、特异性和与其他感染抗体交叉反应的资料，建议任何阳性血清学试验应使用不同抗原的第二次检测来进行确认[31,43]。这将有助于减少假阳性测试的数量。

治疗后1～2个月应用以上提到的技术对随访的血液标本进行再次检测。与血清学相关的一个难题是无法确定患者是再次感染还是治疗失败，因为IgG抗体在很长一段时间内保持升高的水平。疗效监测的血清学方法大部分已被分子方法所取代。血清学试验可在参考实验室和CDC进行。

5. 治疗和预防 苄硝唑(Radamil，Ragonil，Rochagan)和硝呋莫司(Lampit)可降低急性恰加斯病的严重度或消除恰加斯病。苄硝唑已被FDA批准在美国使用[46]。其他药物，包括别嘌醇、氟康唑、伊曲康唑、酮康唑和泊沙康唑已用于治疗有限数量的患者[33,39,45-46]。治疗对急性感染患者比慢性病患者更有益。慢性恰加斯病可能延缓病理后遗症的进展，降低死亡率，但不能消除。这可能是由于未能清除感染或免疫过程已经启动。

治疗效果可通过PCR检测虫荷量的降低来进行监测[33,39,41,45,47]。手术已成功应用于治疗恰加斯心脏病、巨食管症和巨结肠症[30]。

心脏移植自1985年以来一直用于治疗晚期恰加斯心肌病[48]。它是中美洲和南美洲器官移植的优先指标。

直到最近，恰加斯病的控制主要通过杀虫剂杀灭锥蝽媒介来进行。要使控制计划有效，建造防蝽住所及健康教育是必须的。媒介控制、教育和改进住房条件已经使疫区的感染人群从2000多万减少到600万～800万。蚊帐对预防感染也有效。强烈推荐对来自疫区用于输血用途的血液制品进行血清学筛选。可用问卷调查替代献血者的血清学试验来推迟疫区的准献血员献血。无可用的疫苗。

(二)让氏锥虫

让氏锥虫感染中美洲和南美洲的人和其他脊椎动物，并常见于克氏锥虫存在的地区[49]。人类感染无症状，锥鞭毛体可在血液中持续一年以上。让氏锥虫和克氏锥虫可通过相同的锥蝽媒介传播感染。让氏锥虫感染可通过锥蝽吸血时接种其唾液或通过其粪便进行传播[50]。在有些地方，让氏锥虫的感染较克氏锥虫高5～6倍。锥鞭毛体可通过薄血膜和厚血膜或血沉棕黄层浓缩技术从受染患者的血液中检获。吉姆萨或瑞氏染色可使虫体着色。显微镜下，锥鞭毛体不能与非洲锥虫区别，但非洲锥虫不会在美洲出现。让氏锥虫锥鞭

毛体的动基体较克氏锥虫锥鞭毛体小，这点可以将两者区分。PCR 法已用于检测人和媒介的感染[51]。也可通过动物接种诊断法来检测感染。此外，可通过血液培养(Tobie 培养基或 NNN)[21]检查上鞭毛体或将血液接种实验动物(鼠)检查锥鞭毛体。虽然没有血清学实验用于检测让氏锥虫的感染，但发现它和克氏锥虫有血清学交叉反应。

为区分两种感染，临床病史，对急性期和恢复期血清进行血清学试验或采用不同的实验方法，PCR 或血液镜检可能都有帮助。让氏锥虫感染没有推荐的治疗方法。

三、非洲锥虫病

非洲锥虫病局限于中部非洲有采采蝇的区域，那里 6000 万人有感染非洲锥虫病的风险[52]。每年报告的病例少于 1 万例(2015 年为 2800 例)。世界卫生组织的目标是在 2020 年消灭人类非洲锥虫病[52-53]。睡眠病的西非(冈比亚)型由冈比亚布氏锥虫所致，以慢性长期性为特点，99%的睡眠病病例是由其引起；罗德西亚布氏锥虫所致的东非(罗得西亚)型，表现为急性发病及在感染后数月内死亡。冈比亚布氏锥虫感染可持续数月至数年，伴随缓慢的 CNS 累及。在有些疫区，内乱破坏了医疗保健的基础设施和媒介控制，导致这种疾病死灰复燃。

(一)生活史和形态

罗德西亚布氏锥虫和冈比亚布氏锥虫非常接近，无法通过形态学进行区别。过去通过临床表现和地理位置进行区分，而现在可使用分子方法鉴别。罗德西亚布氏锥虫的发病率和死亡率增高，治疗方案也不相同。

血中的锥鞭毛体(图 140-1 和图 140-4)可以是长或细长状，有一根长的鞭毛或是没有游离鞭毛的短粗状(长 14～33 μm，宽 1.5～3.5 μm)，短粗状虫体是采采蝇的感染阶段(完整生活史见 www.cdc.gov/dpdx/index.html)。

使用吉姆萨或瑞氏染色，颗粒状细胞质染成浅蓝色，含有深蓝色颗粒，可能有空泡。位于中央的胞核染成淡红色。动基体位于虫体的后端，染成淡红色，留在胞质内的鞭毛(轴丝)可能看不到。同波动膜一样，鞭毛从动基体发出，延波动膜的外缘延伸直至波动膜在虫体前端与锥虫体融合。在此处，鞭毛游离延伸于虫体之外。采采蝇吸血时锥鞭毛体被其摄入并转变为上鞭毛体(图 140-1)。虫体在蝇的肠中繁殖，约 2 周后，虫体移行回唾液腺。当采采蝇吸血时，唾液腺的循环后期虫体进入叮咬部位，人体被感染。锥鞭毛体有改变外膜表面包被的能力，帮助虫体逃避宿主的体液免疫反应[54]。

(二)流行和传播

在采采蝇体内的发育周期为 12～30 天，平均 20 天。吸食感染者血液后，小于 10%的采采蝇具有传染性。雌性和雄性采采蝇均可传播感染。感染也可通过器官移植、通过胎盘从母亲传给胎儿或通过针刺获得。

虽然没有证据表明冈比亚布氏锥虫可以从动物传播给人，但分离自西非大羚羊、羚羊、鸡、牛和家猪的锥虫株和分离自同一地区人体的虫株是相同的。有证据表明传播有可能完全在人与人之间进行。罗得西亚锥虫病媒介采采蝇吸食猎物血液为生(包括牛)，可以将疾病从人传播至人或从动物传播至人。

有分子生物学证据表明布氏锥虫复合群感染时会出现多虫株感染的情况，这对于毒力、致病力和治疗反应具有流行病学意义[55]。也有证据表明人类白细胞抗原在感染和疾病的进展中起着至关重要的作用[56]。

(三)临床表现

当被感染的采采蝇叮咬后，在叮咬部位会发生局部的炎症反应，1～2 周内自行消退。叮咬部位的皮损可有疼痛，表现为红斑状硬结，可能溃烂。锥鞭毛体进入血流，致无症状的低原虫血症，可持续多月。感染可在这个阶段自愈，没有症状，不侵入淋巴结。皮损可能与昆虫叮咬和皮肤细菌感染相混淆，在数周内消退。

罗德西亚布氏锥虫感染的临床病程和疾病进展较冈比亚布氏锥虫感染更急[57]。诊断症状包括发热、淋巴结肿大(特别是颈后三角淋巴结，被称为韦氏征，这在冈比亚布氏锥虫感染时明显)、痛觉延迟(克氏征)、感染后 6～8 周一过性的红斑状皮肤丘疹。除了淋巴结受累，肝和脾也变大。非

洲锥虫病一期为锥鞭毛体在皮下组织、血和淋巴中繁殖(血淋巴期)。二期为锥鞭毛体穿过血-脑脊液屏障引发中枢神经系统的感染。冈比亚锥虫病时,在睡眠病综合征(CNS受累,脑膜脑炎期,二期)出现之前,血淋巴期(一期)可持续数年。当感染冈比亚锥虫病的患者出现症状时,患者已经进入疾病后期,中枢神经系统受累。

实验室检查可见贫血、粒细胞减少、红细胞沉降率加快和血清 IgM 显著增高。持续高 IgM 水平是由寄生虫产生各种变异抗原以逃避患者的防御系统所致[57]。在免疫功能正常的宿主,未见血清 IgM 增高可排除非洲锥虫病。鉴别诊断包括布鲁菌病、CNS淋巴瘤、HIV感染、利什曼病、疟疾、脑膜炎、回归热、弓形虫病、结核和伤寒。

当锥鞭毛体侵入 CNS,就进入了感染的睡眠病期(Ⅱ期)。冈比亚锥虫病是以稳定渐进性脑膜脑炎、行为改变、情感淡漠、精神混乱、共济失调和嗜睡为特征。罗德西亚布氏锥虫引起更快的暴发性疾病,死亡可以发生在广泛 CNS 受累前。疾病的末期,患者变得消瘦,常由于继发感染导致深度昏迷和死亡。脑脊液(CSF)检查结果包括蛋白和 IgM 水平增高、淋巴细胞增多和发现 Mott 桑葚细胞。桑葚细胞是改变了的浆细胞,其胞质充满了蛋白质小滴。桑葚细胞并非可见于所有患者,然而,它们的出现高度提示 CNSⅡ期疾病。除了在脑脊液中发现锥鞭毛体外,世界卫生组织对 CNS 受累的标准还包括 CNS 液中白细胞计数大于 5 及蛋白水平增高。鉴别诊断包括隐球菌病、HIV、脑膜炎、帕金森病、精神疾病、病毒性脑炎和占位性病变。

(四)诊断

由于大部分感染发生于农村地区,无法采用复杂的诊断技术,诊断依赖于简单直接的检测方法。最终确诊依赖于在血液、淋巴结穿刺物、胸骨骨髓、下疳渗出液和脑脊液中发现锥鞭毛体。罗德西亚布氏锥虫导致的感染较冈比亚布氏锥虫导致的感染更易在体液中检获锥鞭毛体,这是由于前者所致的寄生虫血症虫体的数量高得多。因周期性发热的原因,血液中寄生虫的数量会发生变化,故多种技术必须用于锥鞭毛体的检测。实验室工作人员可能希望联系当地、州或国家公共卫生实验室或 CDC 以获得诊断的信息及在标本选择和可用实验方面获得帮助(https://www.cdc.gov/parasites/sleepingsickness/health_professionals/index.html#dx)。

1. 标本的采集 锥鞭毛体有高度传染性,医务人员需小心谨慎,当处理血、骨髓和抽吸物时需遵循血-骨髓病原体指南采用通用防护措施。由于锥鞭毛体有溶解的可能,因而镜检标本应尽快进行检测。要检获锥鞭毛体,有必要对体液进行连续的检测,特别是对冈比亚锥虫病。血液可采自指尖或静脉穿刺。静脉血应采集于含有 EDTA 的采血管中。在排除锥虫病前应进行多次血液检查。发热时,血液中虫体的数量高,而在非发热时,血液中的虫体数量少。应持续采集 CSF 以排除 CNS 受累。若要检查脑脊液,要收集 1 ml 以上,最好是 5 ml 或更多。因锥鞭毛体数量过少而无法在血中检测到的病例,在炎性淋巴结穿刺物中可能会发现锥鞭毛体,但是试图在组织中检获虫体并不可行。在治疗期间应每 6 个月检查血和脑脊液标本以评估临床反应直至治疗后 2 年。

2. 直接检测

(1)显微镜检查:除了制备薄血膜和厚血膜外,推荐采用血沉棕黄层浓集法以检获寄生虫。当虫数大于 2000/ml 时可在厚血膜上检获虫体;当虫数大于 100/ml 时,可采用在毛细管中进行的血细胞比容浓集或血沉棕黄层定量法检获;当虫数大于 4/ml 时采用阴离子交换色谱法可检获寄生虫。然而,阴离子交换色谱无法轻易应用于临床实验室或现场的研究[58]。对锥虫病疑似病例和确诊病例,要进行强制腰椎穿刺以排除 CNS 受累(Ⅱ期)。脑脊液需离心沉淀后进行检查。由于锥鞭毛体在 10 min 内开始自溶,故脑脊液要立即检查。脑脊液中检获锥鞭毛体即可将疾病定为Ⅱ期(CNS 受累)。

(2)核酸检测:参考实验室使用分子方法(PCR,未经 FDA 批准)来检测感染和鉴别虫种,但这些方法在现场不会常规使用[57,59]。以 PCR 为基础的方法尚未标准化,尚未进行多中心研究验证这些方法。几乎没有研究对各种用于诊断的 PCR 方法进行比较。

(3)培养和动物接种:小型实验动物(大鼠和豚鼠)被用于感染的检测。罗德西亚布氏锥虫较冈比亚布氏锥虫更适合培养(Tobie 培养基)[21]和动物感染,但培养对大多数诊断实验室并不

实用。

3. 血清学试验 用于流行病学筛查的血清学技术(未经FDA批准)包括IFA、ELISA、间接血凝实验、锥虫病卡片凝集实验(CATT)、冈比亚锥虫病乳胶凝集试验和免疫层析试验(Hat Sero-K-SeT和SDBoline HAT 1.0)[57,60]。血清学试验常用于筛查,确诊依赖于显微镜观察到锥鞭毛体。CATT对筛查冈比亚布氏锥虫感染的疑似病例有效,但不适用于罗德西亚布氏锥虫感染。CATT需要冷藏,使其难以在农村地区使用,而免疫层析法不需要用电,因而更易于在现场使用。CATT用于血清学诊断的主要问题包括疟疾感染导致的假阳性结果及许多人因曾暴露于对人类无感染性的动物锥虫而导致抗体水平增高。CATT无法区分现症感染和既往感染[53]。血清和脑脊液IgM浓度显著增高具有诊断意义。由于缺乏参考值及外伤性的穿刺放液可能使血清混入脑脊液,故对脑脊液抗体滴度的解释需谨慎。鞘内免疫球蛋白的产生可见于许多神经炎性疾病。IgM乳胶凝集试验已用于现场脑脊液IgM浓度的检测[58]。

ELISA已用于检测血清和脑脊液中的抗原。由于当血清或脑脊液中锥鞭毛体数量少时试验的敏感性欠佳,生物标记试验(抗原检测)并未广泛使用[61-62]。这个方法也可用于疾病的临床分期以确定是否有CNS的感染及作为治疗的跟踪随访。

(五)治疗和预防

所有确定有活动性感染的患者都应治疗。所使用的药物和疗程取决于锥虫的种类和疾病的临床分期[63]。苏拉明(Bayer 205;Naphuride或Antrypol)是治疗罗德西亚布氏锥虫感染早期血或淋巴期选用的药物,而喷他脒羟乙磺酸盐(Lomidine)或苏拉明是治疗冈比亚布氏锥虫感染早期的药物[57]。冈比亚布氏锥虫感染并怀疑CNS受累时,选用美拉胂醇(Mel B或Arsobal),这个药物可以和糖皮质激素共同给药以降低脑病出现的可能。

二氟甲基鸟氨酸(依氟鸟氨酸,Ornidyl)是对冈比亚布氏锥虫感染急性期和晚期有效的细胞生长抑制药物。它可以单独使用或与口服药物硝呋莫司共同使用。二氟甲基鸟氨酸对晚期罗德西亚布氏锥虫感染无效。显微镜下血液、淋巴液或脑脊液中锥鞭毛体消失及脑脊液中白细胞减少可判断治疗有效[56]。成功治疗后,脑脊液抗体(IgM)及白介素-10下降[64]。每个非洲锥虫病治疗者在治疗完成后的2年应每6个月进行一次监测。冈比亚布氏锥虫复发可用二氟甲基鸟氨酸或美拉胂醇治疗。

人群筛查已用于控制冈比亚布氏锥虫的感染。媒介控制措施并不太成功。最有效的控制措施是一个综合方法,包括减少可作为保虫宿主的人感染者及使用杀虫剂和捕蝇器[57]。使用DEET(N,N-二乙基-间-甲苯酰胺)和苄氯菊酯浸渍衣料或其他的昆虫驱避剂对采采蝇并不是特别有效,但它确实阻止了其他昆虫的叮咬。采采蝇会被明亮和深色衣服(蓝色和黑色)吸引。当人进入疫区时应穿保护衣(长袖衬衫和长裤)。无可用的疫苗。

四、其他感染人体的锥虫

(一)刚果锥虫(*Trypanosoma congolense*)

只有1例刚果锥虫人体感染的报道,并经DNA鉴定证实[65]。患者混合感染了布氏锥虫,喷他脒治疗成功。

(二)伊氏锥虫(*Trypanosoma evansi*)

伊氏锥虫的首例人体感染病例诊断于印度[3,66]。这个种常被认为是动物的寄生虫(水牛、骆驼、牛、马和大鼠),地理分布广泛(非洲、亚洲和中美洲、南美洲)。感染通过吸血昆虫如螯蝇和马蝇机械性传播。在动物,潜伏期为5～60天,疾病的严重程度从没有症状到虚弱、体重减轻、贫血、流产至死亡。在以上提及的人体病例,患者主诉有一过性发热和感觉障碍。每7～10天出现发热峰,发热时血液中检出大量的虫体。脑脊液中未发现虫体。使用苏拉明成功治疗患者。正常情况下,人血清有自然溶解锥虫的活性,但此患者被证实有载脂蛋白L-1(APOL1)突变,而APOL1具有溶锥虫活性[67]。实验室诊断常通过检测血和淋巴结穿刺物或活检标本完成。伊氏锥虫可在小鼠和大鼠体内培养[68]。

伊氏锥虫无法通过镜检与冈比亚布氏锥虫、罗德西亚布氏锥虫或让氏锥虫区分。

(三)路氏锥虫(*Trypanosoma lewisi*)

路氏锥虫的人体感染病例已在印度和泰国的

儿科患者中有报道[69-72]。这些患者的血中检获锥鞭毛体。在这些病例中，患者未经治疗即从感染中完全康复。症状包括持续发热、血小板减少，肝脾肿大和肝酶增高。此感染在人群中的流行还不知晓。

动基体位于锥鞭毛体后端接近端点处，胞核位于前端，终止于鞭毛从锥鞭毛体游离处。路氏锥虫可自然感染野生大鼠，被认为无致病性。中间宿主为跳蚤，虫体在跳蚤的肠中增殖并发育为上鞭毛体，上鞭毛体见于盲肠和粪便。易感大鼠通过食入跳蚤或其粪便获得感染。人体感染被认为是通过相似的方式传播。

参考文献请扫二维码查阅

第141章 弓形虫

JAMES B. McAULEY, KAMALJIT SINGH

（胡媛 译；马莹、曹建平 审校）

弓形虫病是由刚地弓形虫感染引起的寄生虫病。它是一种人常见的寄生虫感染，通常没有明显症状。但在临床上，它可以引起严重的致残性疾病，因此，准确和及时的诊断至关重要。

一、分类

刚地弓形虫是顶复门球虫纲球虫目艾美亚目弓形虫属，见第135章。

二、生活史

刚地弓形虫可感染大部分温血动物（包括人），宿主通过摄取组织包囊或被卵囊污染的植物而感染。已知猫科动物家族是刚地弓形虫有性生殖阶段的终宿主，是感染阶段主要的保虫宿主。这种胞内寄生虫的3个阶段是：①速殖子（滋养体），在急性感染阶段迅速增殖并破坏被感染细胞；②缓殖子，在组织包囊中缓慢增殖；③卵囊中的子孢子（图141-1）。速殖子和裂殖子存在于身体组织中，卵囊随猫的粪便排出（图141-2）。猫通过食用感染的动物、动物的排泄物或摄取卵囊而感染刚地弓形虫。流浪猫比关在室内的家猫更容易感染。当组织包囊或卵囊被猫摄取后，活的病原被释放，并侵入小肠上皮细胞，在经历无性繁殖阶段后进入有性繁殖阶段，然后形成卵囊，随后排出。未孢子化（非感染性）的卵囊排出后1～5天成为孢子化（感染性）卵囊。虽然猫排卵囊时间只有1～2周，但会排出大量的卵囊，每克粪便含超过100 000个。卵囊在外界环境中可以生存几个月甚至1年以上，对消毒剂、冷冻和干燥有显著的抵抗力，但70℃加热10 min可被杀死[1]。

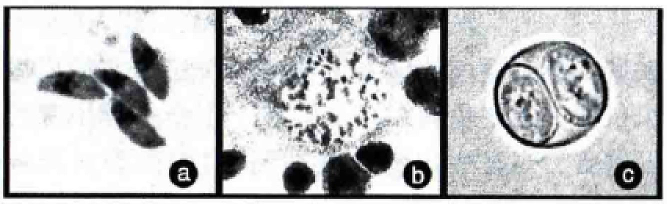


图141-1 刚地弓形虫生活史3个阶段

注：a. 速殖子（吉姆萨染色）；b. 脑组织中含有缓殖子的包囊（吉姆萨染色）；c. 未染色的子孢子卵囊（照片由美国马里兰州贝兹维尔农学院的J. P. Dubey提供），见彩插

三、流行和传播

血清流行病学数据表明，弓形虫病是全球各地人类最常见的传染病之一[2]。由于弓形虫病患者很少能检测到刚地弓形虫病原，因此血清学试验弓形虫特异性抗体用来判断是否存在感染。阳性血清的滴度随着年龄的增长而增加。在世界很多地区，相比于寒冷的气候和山区，温暖的气候和低纬度地区弓形虫感染更为常见。这种分布与有利于孢子生成和卵囊生存的条件密切相关。不同的地域之间、同一区域不同人群之间，由于暴露程度的差异，患病率也会不同。在感染高发的法国，高感染率（50%～80%）与当地居民喜欢吃生的或未煮熟的肉的习惯有关。然而，中美地区高发病率与流浪猫的数量和适宜卵囊生存的气候相关。在1962年美国入伍新兵中，沿海地区人群血清阳性率超过30%，而在落基山脉和西南沙漠地区人群血清阳性率低于1%。最近的研究数据表明：1989年美国新兵血清抗体阳性率比1962年下降了1/3[3]。在1988－1994年，美国第三次全国健康和营养评估调查（NHANES Ⅲ）中，12岁或12岁以上的人群血清阳性率为22.5%，15～44岁的

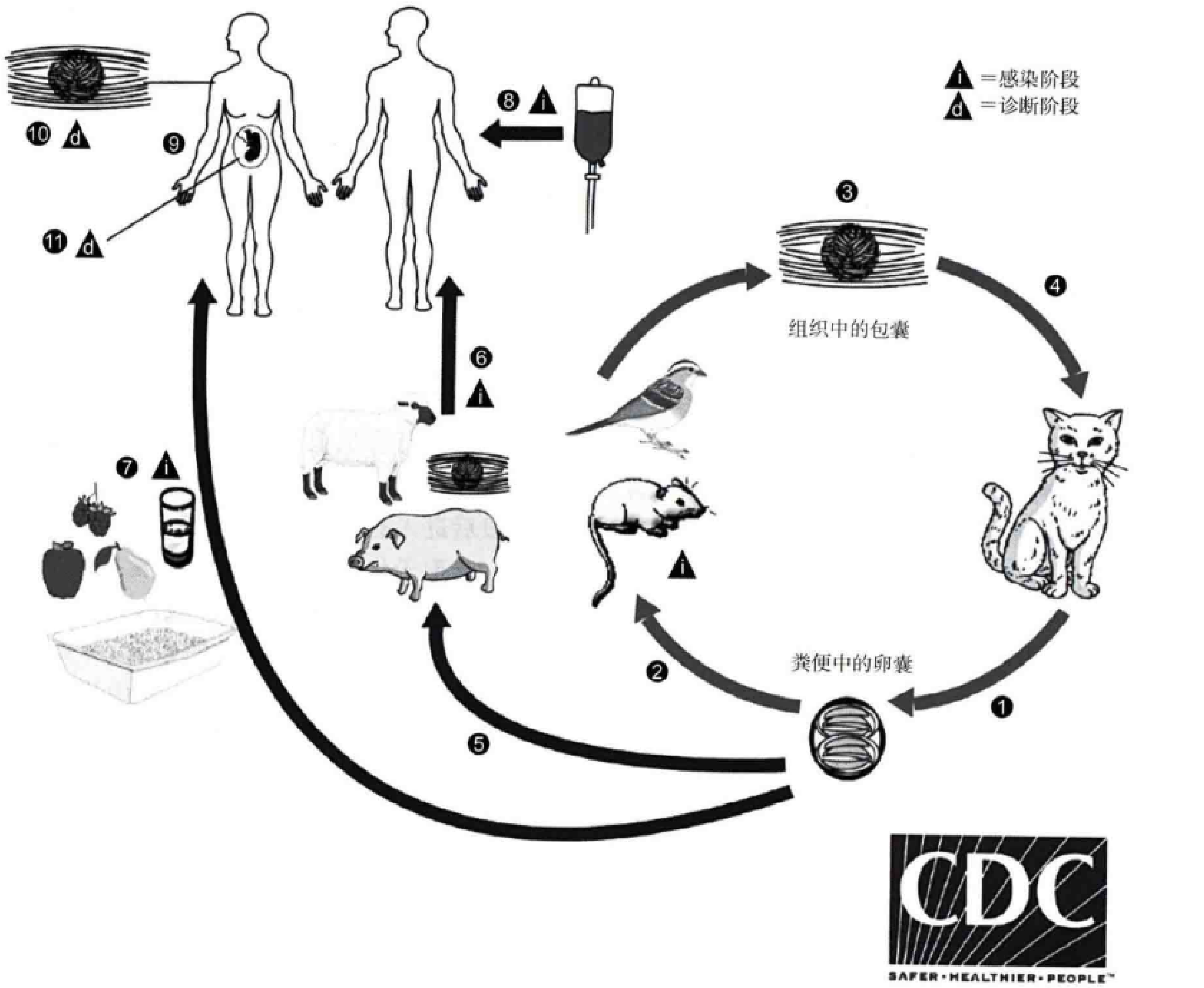


图 141-2 刚地弓形虫的生活史

注：①未受精的卵囊随猫粪便排出；尽管卵囊排出的时间只持续 1～2 周，但排出的数量会很多。②中间宿主（包括鸟和老鼠）通过摄取被卵囊污染的土壤、水和植物而感染。③卵囊转化为速殖子，定位在肌肉和神经组织的速殖子发育为组织包囊缓殖子。④猫吞食中间宿主体内的组织包囊或摄取孢子化的卵囊而感染。⑤家畜和野生动物因摄入孢子化的卵囊也感染形成组织包囊。人感染的几种途径：⑥吃未煮熟的含有组织包囊的动物的肉；⑦进食被猫粪污染的食物或水，或是接触了污染的物质（如粪便污染的土壤或宠物猫的猫砂）；⑧输血或器官移植；⑨经胎盘从母体传给胎儿；⑩尽管染色的活检样本可以看到组织包囊，诊断还通常是血清学试验完成的；⑪先天性感染的诊断是采用分子生物学方法如 PCR，通过检测羊水中弓形虫 DNA 来完成，见彩插

育龄妇女血清阳性率为 15%[4]。最近，NHANES 数据分析显示，在美国出生的 12～49 岁人群中，刚地弓形虫血清阳性率从 1988－1994 年的 14.1%下降至 1999－2004 年的 9.0%[5]。

人可通过如下几种途径感染：①食用未煮熟的含有刚地弓形虫包囊的肉；②通过手、食物、土壤或是猫粪污染的水源摄入了卵囊；③器官移植或是输血感染；④经胎盘传播；⑤意外接种了速殖子。弓形虫感染人的 2 个主要途径是经口和先天性传播。在人体内，无论是摄入组织包囊或卵囊均会导致囊壁破裂[6]，病原释放并侵入肠道上皮，传播到全身，并在细胞内繁殖。宿主细胞死亡并且释放速殖子，速殖子入侵邻近的细胞并持续这个过程。通常在骨骼肌、心肌和大脑组织，速殖子在宿主免疫反应的压力下转变为缓殖子并形成组织包囊。这些包囊在宿主的整个生命过程中都可以保留。当宿主出现免疫抑制，包囊破裂时释放出寄生虫，临床疾病会复发。

最近，研究人员开始意识到，在世界不同地区出现的弓形虫基因型不同，也可以解释传播、反应性和疾病严重程度的差异[7]。

四、预防

流行病学研究中确定刚地弓形虫感染的危险因素包括吃生的或未煮熟的猪肉、羊肉、羔羊肉、牛肉、肉制品、牡蛎、蛤、蚌类或野味，养猫，清理猫砂，接触土壤(园艺和庭院工作)，以及吃生的或未洗的蔬菜和水果[1,4,8-10]。最早在美国疾病预防控制中心的一次会议上讨论并推荐所有人包括孕妇，都要预防弓形虫病[1]。现在这个结论已有更新(见寄生虫病的分类和疟疾的网站：http://www.cdc.gov/parasites/toxoplasmosis/prevent.html)。这些建议包括：①食物应该烹饪至安全的温度(牛肉、羊肉、烤小牛肉和牛排至少是145℉ 3 min；猪肉、肉制品和野味至少是160℉，家禽是165℉ 3 min；1℉＝－17.2℃)。②水果和蔬菜在吃前应该去皮或彻底清洗。③砧板、盘子、柜台、餐具和手在接触生肉、家禽、海鲜或未洗的水果和蔬菜后应该用热肥皂水清洗。④由于猫的排泄物会混在沙土里，因此做园艺或者与沙土有任何接触都应该戴手套，且工作完成后要洗手。怀孕的妇女不要处理猫砂，如果一定要处理，须戴手套，并且事后彻底洗手。猫砂应该每天清理，因为刚地弓形虫卵囊需要至少一天的时间发育成感染性的卵囊。怀孕的妇女可以养家猫，但不要接触流浪猫。猫只能喂食罐头、市售的猫粮或餐桌上的熟食，而不能喂生肉或未煮熟的食物。已报道的多次暴发与饮用包囊污染未处理的水相关。将肉类在零度以下冻存几天可大大降低感染的风险[1]。

五、临床表现

弓形虫病分为4类：①免疫功能正常获得性感染，②免疫功能缺陷获得性感染，③先天性感染，④眼部感染。诊断方法及其描述可因临床分类而存在差异。

免疫功能正常的人群感染弓形虫通常没有症状，10%～20%的急性感染患者可能发展成颈部淋巴结病和(或)类似流感的疾病。临床感染过程是良性自限性的，通常症状在数周或数月内消失。

免疫缺陷患者常常有中枢神经系统的症状，也有可能是心肌炎或肺炎。在艾滋病患者中，弓形虫脑炎是颅内损伤最常见的原因，认为是慢性感染重新激活引起的反应。接受免疫抑制剂治疗的弓形虫病患者常常会导致新发感染或潜伏性感染被激活[11-12]。

先天性弓形虫病是母亲在怀孕期间感染弓形虫导致的结果。先天性弓形虫病的发病率和严重性与妊娠的前3个月感染密切相关[13]。因为对于母亲的治疗可以减轻婴儿先天性感染的临床症状，及时准确的诊断非常重要。亚临床感染的婴儿在出生后会逐渐表现出先天性弓形虫病的症状和体征，然而，及时治疗可有助于阻断后续的症状。

在美国，眼弓形虫病是脉络膜视网膜炎的一个重要原因，可能是先天性或者是获得性感染的结果[14]。现在认为获得性感染比先天性感染更为常见，可见于免疫功能正常或缺陷的人群。先天性感染可以没有症状，直到生命中的第二个或第三个十年，当病变累及眼睛，推测可能是囊肿的破裂，后续释放速殖子或缓殖子。脉络膜视网膜炎在先天性感染的患者中常表现为双眼的感染，但在急性获得性刚地弓形虫感染的患者常表现为单眼的感染。

最近的数据表明刚地弓形虫感染与各种神经或精神症状相关，包括精神分裂症、阿尔茨海默病甚至自杀[15-17]。这些发现很有趣，但需要进一步的研究来验证。

六、标本的采集、运输和储存

血清、血浆、脑脊液、眼部液体和羊水可用于检测抗体和(或)寄生虫的DNA[2]。

(一)采集样本检测寄生虫DNA

采集血液标本时需要使用抗凝剂，脑脊液、眼液、羊水不需要使用抗凝剂。所有的样本在检测前都应该在4℃运输和储存。

(二)采集样本测定寄生虫抗体

检测血液中的抗体应该进行凝血和离心，收集血清并送至参比实验室。在大多数检测中，溶血似乎并没有干扰抗体反应。至少应提交3 ml血清和1 ml脑脊液给实验室进行检测。样本在4℃可以储存1周，冻存可以储存更长的时间。样本一般可以在室温下过夜运输，如果运输需要持续几天，可以

加冰块或冰盒进行运输。为了避免小量样本的蒸发,眼液应冷冻后储存或运输。脑脊液、眼液应该和血清样本在同一天进行平行检测。样本可以在−20℃或以下长期储存。

如果检测是为了确定免疫状态,单份的血清样本就足够了,没有必要再使用急性或恢复期的样本。如果检测是为了确定感染的时间,间隔至少3周采集的样本可能有帮助,也可能没有帮助。在大部分情况下,很难检测到IgG或IgM滴度增加,因为在最初的样本被采集时,抗体滴度已达到平台期。如果2份样本要进行比较,它们应该进行平行检测。如果检测是在不同的时间、不同的实验室或是不同的过程,则不应该进行定量的比较,而仅仅进行阳性或阴性的定性比较。

血清学之外的检测需要采集样本前联系参比实验室获得指导,以确保正确采集和处理样本。

七、直接检测

(一)显微镜检查

通过在患者样本中观察到寄生虫,诊断为弓形虫病的记录很少[18-19]。分泌物、排泄物、体液和组织都是可能直接观察到寄生虫的样本,但通常很少能找到寄生虫。液体标本,如加肝素的血液或脑脊液,应该先离心,沉淀再进行涂片、镜检。涂片应该风干,甲醇固定,再进行吉姆萨染色后镜检。可以观察到速殖子单独存在,或存在于宿主细胞如白细胞中。保存完好的速殖子呈新月形并且染色较好,但退化的速殖子可能呈椭圆形并且染色较差。用吉姆萨染色的组织印片可以显示弓形虫的包囊。

(二)抗原检测

免疫学技术已被用于识别组织切片或组织培养物中的寄生虫。异硫氰酸荧光素或过氧化物酶标记的抗血清可用来检测组织切片中的速殖子。酶免疫测定(EIA)抗原检测技术对人类样本缺乏敏感性,不推荐。

(三)核酸检测

核酸扩增试验(nucleic acid amplification testing, NAAT)用于检测弓形虫DNA是一项越来越重要的技术,已用于检测免疫功能正常人群先天性的弓形虫感染、弓形虫眼部疾病和艾滋病患者弓形虫脑炎[20-28]。NAAT技术最重要的应用是对羊水进行先天性弓形虫病的产前诊断。当孕妇的血清学试验结果提示怀孕期间存在潜在的感染,用羊水进行NAAT检测来确定胎儿是否感染非常重要,它比传统的方法如接种老鼠、组织细胞培养或胎儿血液中IgM检测更加敏感[29-30]。弓形虫的NAAT技术由弓形虫血清学实验室Palo Alto, CA(http://www.pamf.org/serology/)和少数一些商业实验室提供。已有商业化的检测试剂(ELITe MGB)检测结果可与参比实验室相媲美[31]。重复序列AF146257靶基因(即已知的Rep529)已经大量的取代了其他的NAAT靶标,如B1基因。检测者应该意识到NAAT检测的可靠性差异性很大[20,32-35]。低密度的NAAT检测芯片已被成功地用于肉芽肿性淋巴腺炎的评价[33]。最近,环介导等温扩增技术已被用于检测血液中的弓形虫DNA[37]。

(四)细胞介导的免疫反应

在新生儿先天性弓形虫病中的T细胞反应已被研究,最近的一项研究显示,可将特异性弓形虫抗原刺激后,T细胞产生的γ干扰素的含量检测加入到先天性感染的诊断中[38]。γ干扰素释放实验,已被成功地用于检测婴儿先天性感染的细胞免疫反应[39]。

八、分离方案

通过接种患者的组织或体液至小鼠体内,或组织培养细胞可分离寄生虫,但成功概率有限[40]。新鲜的组织样本在生理盐水中,用研钵和研杵研磨后,腹腔注射接种到老鼠体内,或直接加入到培养瓶中。观察老鼠4~6周,如果有弓形虫感染小鼠,寄生虫可以在接种后的5~10天,在小鼠腹水中观察到。然而,如果弓形虫对小鼠毒性较弱,通常小鼠不会因为感染而致命。如果小鼠存活超过6周,它们的血清样本应该进行血清学检查。如果有抗体存在,小鼠的脑组织应该进行弓形虫包囊的检查。如果没有观察到包囊,小鼠可能不是理想的宿主。将初次接种的小鼠脑组织匀浆,再接种其他的小鼠,6周后复查。刚地弓形虫会在各种组织细胞中生长。在培养后24~96 h,会出现细胞病变效

应。吉姆萨染色可以揭示寄生虫的结构，但有虫体寄生的细胞很难检测到。免疫荧光技术可以更加敏感的检测到病原。使用下面的方法可以成功地从羊水中分离到寄生虫[2,41]。以 1000×g 的速度对 10 ml 的羊水样本进行离心，用至少 8 ml 的基本培养基对沉淀进行重悬，取 1 ml 滴加到盖玻片中，放入 24 孔板中的人类胚胎成纤维细胞 MRC5 中。共孵育 96 h，在 24 h 更换培养基。用冷丙酮固定培养物，用间接免疫荧光技术检测盖玻片上是否存在刚地弓形虫。用组织细胞分离可以比接种老鼠更快的获得诊断的结果。这 2 种方法都可以用于先天性弓形虫病的诊断。

九、血清学试验

刚地弓形虫特异性抗体的血清学试验是弓形虫病诊断中最常用的方法。自从 Sabin 和 Feldman 发明了亚甲蓝染色试验(DT)，许多用于弓形虫抗体检测的试验已得到使用[2,35,42]。凝集试验、间接荧光抗体试验(IFA)和酶免疫实验(EIA)的商业化试剂盒在世界范围内广泛应用。高通量检测实验室中，多种平台包括多重芯片、半自动的免疫测定等可进行大量样本和多种病原体的检测[43-44]。由于从临床上有记录的弓形虫病患者获取样本困难，商业化试剂盒的敏感性和特异性，不是基于有记录的病例样本检测得到的，而是与其他试剂比较获得的。因此，试剂真实的敏感性和特异性一般是未知或不确定的。由生产商或发表的文章中公布的价格可能会根据选择的测试样品而有所不同。敏感性和特异性取决于前瞻性研究，在弓形虫检测中，随机样本的检测与回顾性研究不同，当选择的样本作为真阴性或真阳性时，这些样本降低了反应中假阳性或假阴性的概率。

当实验室人员决定使用弓形虫特异性抗体，或者决定用不同的抗体检测试剂盒，使用者必须仔细检查试剂的包装说明书，检索发表文献的关于敏感性和特异性的信息。使用者应该使用弓形虫病参比实验室验证过的阳性或阴性样本进行试剂的实验室内比较。表 141-1 和表 141-2 列出了美国可用的商业试剂和发表的评估文献。由于试剂公司有很大的流动性，公司和试剂的名称会发生改变。

表 141-1 美国商业化的弓形虫 IgG 抗体检测试剂盒

试验方法和公司[a]	试剂盒	参考文献
间接免疫荧光试验(IFA)		
GenBio	ImmunoFA Toxoplasma IgG	
Hemagen	Virgo Toxo IgG	
Inverness	Toxoplasma IgG	
Meridian	Toxoplasma IgG	
酶免疫测试(EIA)		
Abbott Labs	IMxToxo IgG	18, 38, 50, 52, 67, 93
	AxSYMToxo IgG	24, 42, 84, 89, 105
Bayer Diagnostics	Immuno1	93
	Advia Centaur	86
Beckman Coulter	Access Toxo G	19
bioMérieuxVitek	Vidas Toxo IgG	38, 42, 52, 89, 100, 105, 106
Bio-Rad	Platelia Toxo G	52, 89
Biotecx	OptiCoat Toxo IgG ELISA	
Biotest Diagnostics	ToxoIgG	
Diagnostic Products Corp.	Immulite Toxoplasma IgG	24, 32, 106
Diamedix	Toxoplasma IgG	
DiaSorin	Toxoplasma IgG	
	Liaison	107
GenBio	Immunodot Torch	
Hemagen	Toxoplasma IgG	
Inverness	Toxo IgG Ⅱ	

（续 表）

试验方法和公司[a]	试剂盒	参考文献
Roche Diagnostics	ElecsysToxo IgG	
Trinity Biotech	Captia Toxoplasma gondii IgG	
Teco Diagnostics	Toxoplasma IgG	
乳胶凝集试验(Latex)		
Biokit	Toxogen	

注：[a]Abbott Labs, Diagnostics Division, North Chicago, IL 60064; AniLabsystemsLyd., Tiilitie 3, 01720 Vantaa, Finland; Bayer Diagnostics, 511 Benedict Ave., Tarrytown, NY 10591; Beckman Coulter, 4300 N. Harbor Blvd., Fullerton, CA 92834; Biokit USA, 113 Hartwell Ave., Lexington, MA 02173; bioMérieux, 595 Anglum Dr., Hazelwood, MO 63042; BioRad, 4000 Alfred Nobel Dr., Hercules, CA 94547; Biotecx Laboratories, 6023 S. Loop East, Houston, TX 77033; Biotest Diagnostics Corp., 66 Ford Rd., Suite 131, Denville, NJ 07834; Diagnostic Products Corp., 5700 W. 96th St., Los Angeles, CA 90045; Diamedix Corp., 2140 N. Miami Ave., Miami, FL 33127; DiaSorin, P. O. Box 285, Stillwater, MN 55082; GenBio, 15222A Avenue of Sci-ence, San Diego, CA 92128; Hemagen Diagnostics, 34-40 Bear Hill Rd., Waltham, MA 02154; Inverness Medical Professional Diagnostics, 2 Research Way, Princeton, NJ 08540; Meridian Bioscience, 3471 River Hills Dr., Cincinnati, OH 45244; Roche Diagnostics Corp., 9115 Hague Rd., Indianapolis, IN 46250; Teco Diagnostics, 1268 N. Lakeview Ave., Anaheim, CA 92807

表 141-2 美国商业化的弓形虫 IgM 检测试剂盒

试验方法和公司[a]	试剂盒	参考文献
间接免疫荧光试验(IFA)		
GenBio	Immuno FAToxoplasma IgM	
Hemagen	Virgo Toxo IgM	
Inverness	Toxoplasma gondii IgM	
Meridian	Toxoplasma IgM	
酶免疫测试(EIA)		
Abbott Labs	IMxToxo IgM	20, 52, 67, 71, 108
	AxSYMToxoIgM	19, 42, 89, 109
Bayer Diagnostics	Immuno1	
	Advia Centaur	86
Beckman Coulter	Access Toxo M	19, 20, 29, 69
bioMérieuxVitek	Vidas Toxo IgM	5, 19, 42, 52, 89, 108, 109
Bio-Rad	Platelia Toxo IgM	20, 52, 68, 89, 108
Biotecx	OptiCoat Toxo IgM	
Biotest Diagnostics	Toxo IgM	
Biokit	Toxoplasma IgM	
Diagnostic Products Corp.	Immulite	32, 106
Diamedix	Toxoplasma IgM	107
DiaSorin	Toxoplasma IgM	
	Liaison	89
Hemagan	Toxoplasma IgM	
Trinity Biotech	Captia Toxoplasma gondii IgM	
Inverness	Toxo IgM	
Teco Diagnostics	Toxoplasma IgG	

注：[a]Abbott Labs, Diagnostics Division, North Chicago, IL 60064; Bayer Diagnostics, 511 Benedict Ave., Tarrytown, NY 10591; Beckman Coulter, 4300 N. Harbor Blvd., Fullerton, CA 92834; Biokit USA, 113 Hartwell Ave., Lexington, MA 02173; bioMérieux, 595 Anglum Dr., Hazelwood, MO 63042; BioRad, 4000 Alfred Nobel Dr., Hercules, CA 94547; Biotecx Laboratories, 6023 S. Loop East, Houston, TX 77033; Biotest Diagnostics Corp., 66 Ford Rd., Suite 131, Denville, NJ 07834; Diagnostic Products Corp., 5700 W. 96th St., Los Angeles, CA 90045; Diamedix Corp., 2140 N. Miami Ave., Miami, FL 33127; DiaSorin, P. O. Box 285, Stillwater, MN 55082; GenBio, 15222A Avenue of Science, San Diego, CA 92128; Hemagen Diagnostics, 34-40 Bear Hill Rd., Waltham, MA 02154; Inverness Medical Professional Diagnostics, 2 Research Way, Princeton, NJ 08540; Meridian Bioscience, 3471 River Hills Dr., Cincinnati, OH 45244; Teco Diagnostics, 1268 N. Lakeview Ave., Anaheim, CA 92807.

在美国，大部分实验室初步检测 IgG 抗体通常是使用 EIA 或者是 IFA 商业试剂。结果可能以国际单位[基于由英国威尔士的公共卫生机构 Singleton 医院分发的弓形虫 WHO 国际标准参考血清[36,45]（SwanseaSA2 8QA, Wales, United Kingdom; http://www.wales.nhs.uk/)]表示，或以一个指数（对每种试剂都是特异性的）、抗菌药物光密度值（对每种试剂都是特异性），或者是几何平均滴度呈现出来，试剂间定量的结果不能进行比较，只能进行阴性（无反应性或者未感染）或阳性（反应性或者感染）的定性比较。尽管弓形虫特异性 IgG 水平增高是近期感染的指征，但初次感染后数年，IgG 一直保持较高的水平，因此，不应该依赖于该指标。

检测弓形虫特异性 IgM 抗体更多是用来区分急性或慢性感染。IgM 最重要的应用是阴性反应基本排除了近期的感染。弓形虫 IgG 和 IgM 血清学结果的解释指南已列于表 141-3 中。IFA 试验，一般 IgM 滴度是在出现症状的一周内增加，在感染后的 6～9 个月转为阴性。假阳性反应常由类风湿因子引起，假阴性反应是整个血清样本被检测时，在 IFA 试验或间接 EIA 试验中，IgM 被弓形虫特异性 IgG 封闭所导致。为减少这些干扰因素，应将样本进行处理，以仅获得 IgM 片段用于检测。

表 141-3　商业化试剂检测刚地弓形虫血清特异性 IgG 和 IgM 抗体的解释指南

IgG 结果	IgM 结果	人(除了婴儿)报告/解释
阴性	阴性	没有弓形虫感染的血清学证据
阴性	可疑	可能是急性感染的早期或假阳性 IgM 反应。需采集新样本进行 IgG 和 IgM 检测。如果二次样本检测结果相同，则患者很可能没有感染弓形虫
阴性	阳性	可能是急性感染或假阳性 IgM 反应。需采集新样本进行 IgG 和 IgM 检测。如果两次样本检测结果相同，则 IgM 反应很可能是假阳性
可疑	阴性	不确定。需采集新样本进行检测或用不同的试验来检测这个样本的 IgG
可疑	可疑	不确定。需采集新样本进行 IgG 和 IgM 检测
可疑	阳性	可能是急性感染。需采集新样本进行 IgG 和 IgM 检测。如果两次样本检测结果相同，或者如果 IgG 检测为阳性，这些样本需要送到有弓形虫诊断经验的参比实验室进行进一步检测
阳性	阴性	感染弓形虫超过 1 年
阳性	可疑	可能感染弓形虫超过 1 年或者是假阳性 IgM 反应。需采集新样本进行 IgM 检测。如果两次样本检测结果相同，这些样本需要送到有弓形虫诊断经验的参比实验室进行进一步检测
阳性	阳性	可能是最近感染(12 个月内)或假阳性 IgM 反应。样本需要送到有弓形虫诊断经验的参比实验室进行进一步检测

EIA 试验中 IgM 捕获消除了 IgG 或其他独特型的干扰，只结合 IgM 抗体，未结合的抗体通过洗板的时候被移除，这样就不需要进行血清组分的分离。相比于其他的 IFA 试验，EIA 试验中 IgM 捕获最大的优点是增加了先天性感染的检测阳性率。在被证实是先天性感染的新生儿中，IgM 酶联吸附试验（ELISA）血清阳性率为 73%，而同样的血清样本在 IFA 试验的 IgM 检测中，阳性率只有 25%[46]。尽管 EIA 捕获系统在急性感染的检测中更加有效，但在一些人群中仍检测不到或只有低水平的 IgM 抗体，一些人在感染后 2 年仍可检测到 IgM 抗体[2,47]。因此，只用此系统来确定相对的感染时间是不太可能的。许多商业公司开发了检测 IgM 的 EIA 试剂盒，一些用间接 EIA 方式进行血清预处理，其他公司用 IgM 捕获的方式进行。因未知原因导致的 IgM 假阳性反应可能是商业试剂盒的一个难题[48]。

弓形虫 IgG 亲和力试验是区分既往和新近获得性感染的另一工具[2,25,34,38,49-52]。在急性感染期，可观察到 IgG 与抗原结合力较弱，或是亲和力低，而在慢性感染期，抗体与抗原结合力要强（高亲和力）。通过这种方法的使用，高亲和力的结果显示感染至少发生在 3～5 个月之前。然而，低亲和力的结果并不一定是最近获得性感染，因为低亲和力抗体在感染后 1 年还可以检测到。bioMerieux 公司的 Vidas 弓形虫抗体亲和力检测试

剂盒，是唯一通过美国 FDA 认证的检测试剂。在美国以外的许多公司，如 AniLabsystems[53]，bioMérieux[24, 54]和 DiaSorin[55]，多种商业检测试剂盒都是可以购买到的。

其他检测有助于明确现症感染。对新生儿疑似先天性感染的，应进行弓形虫特异性 IgA 和 IgM 抗体的检测[56-58]。成年人 IgA 检测结果不太一致[59]。弓形虫特异性 IgE 抗体的检测也有助于判断是否为急性感染，尽管 IgE 抗体检测的报告有喜忧参半的效用[60-61]。免疫印迹试验在确定先天性感染[62-63]和眼型感染[64]中也有一定的作用。这些和其他一些试验在美国弓形虫血清实验室 Palo Alto 医学基金会[Palo Alto, CA; http://www.pamf.org/serology/; phone, (650) 853-4828]和一些欧洲的弓形虫参比实验室（例如，国家弓形虫病参考中心，Maison Blanche 医院，法国亚丁 Reims Champagne 大学，http://cnrtoxoplasmose.chu-reims.fr/lang=en）是可以检测的。

临床使用指南和刚地弓形虫血清学试验的说明《弓形虫血清学试验的临床使用和解释指南》由临床实验室标准协会发行[66]（前身为国家临床实验室标准委员会），并且可以在他们的网站上购买（www.clsi.org）。

十、诊断试验的临床应用

有 4 类患者对弓形虫的诊断至关重要：孕妇在妊娠期间感染、新生儿先天感染、脉络膜视网膜炎患者和免疫力低下者。诊断实验的选择依赖于患者的免疫学状态和临床的表现。

(一) 免疫状态的确定

确定免疫状态和急性获得性感染的血清检测方法如图 141-3 所示。关于个体的免疫状态有用的信息包括如下 3 个时间点的基础信息：①怀孕前；②接受免疫抑制治疗前；③确定为 HIV-1 阳性后。使用一个检测 IgG 抗体敏感的试验来对一份血清样本进行筛查即可，如 DT、IFA 或 EIA。阴性的结果表明患者未感染。阳性的结果表明患者在某个不确定的时间有一定程度的刚地弓形虫感染。

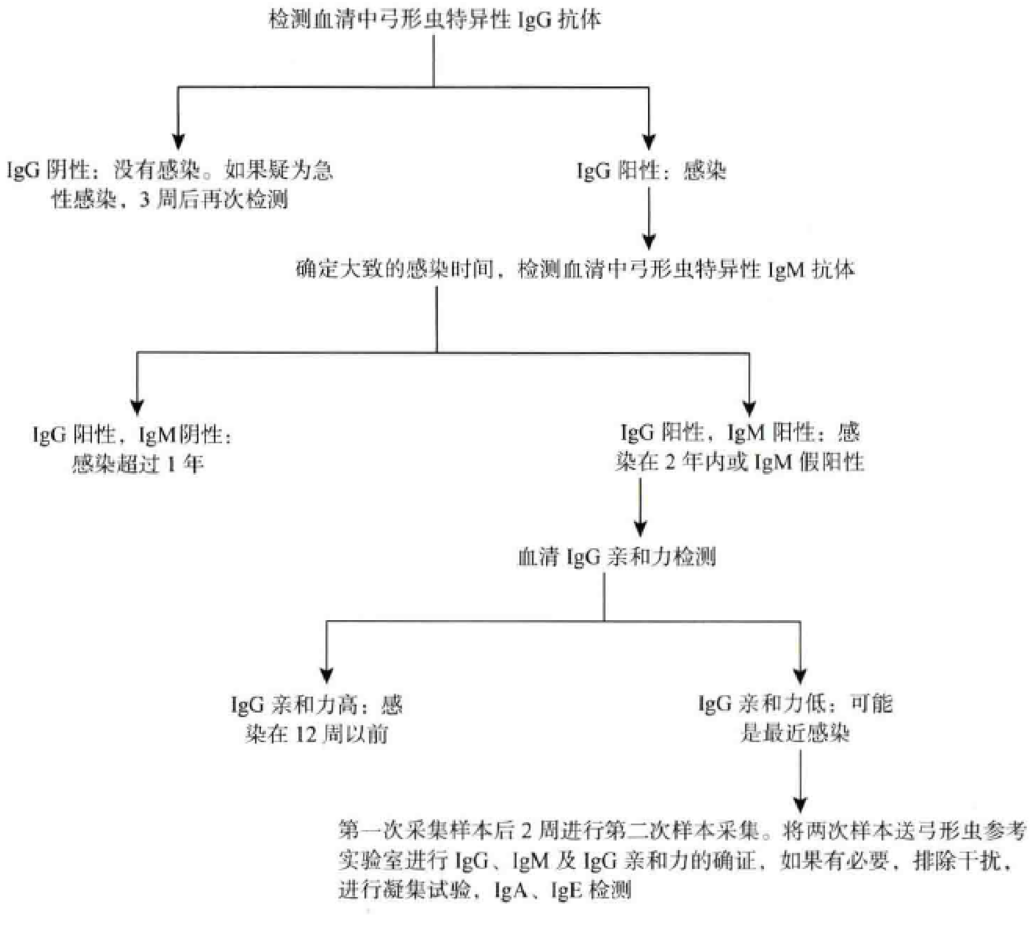


图 141-3 1 岁以上人群弓形虫血清诊断示意图

(二)急性获得性感染的诊断

对于免疫功能正常的患者,如疑似急性获得性感染,应对患者血清进行弓形虫特异性抗体检测(图141-3)。DT、IgG IFA试验或IgG EIA试验阴性基本可以排除急性弓形虫感染。典型的淋巴结病提示急性弓形虫病,同时有IgG EIA(或DT或者IgG IFA)阳性和IgM EIA阳性,提示急性感染[54,67-68]。早期感染少见,患者可表现为IgM阳性IgG阴性的结果,IgG不久也转为阳性。当3周后采集的样本用同样的试验进行平行检测,血清抗体从阴性转为阳性或是滴度增加4倍,表明最近有感染。然而,这种情况比较少见,因为采集时,抗体滴度通常已达到平台期,观察感染后滴度的变化已经太迟了。

用IgM捕获的EIA、IgM免疫吸附凝集试验进行IgM检测可确定急性感染,IgG亲和试验检测IgG抗体的存在可进一步提供支持,或否定急性感染的证据[2,35,69]。IgM阴性基本可以排除之前6个月的感染。IgM和IgG均阳性提示为急性感染,IgM持续阳性或许是假阳性反应。

(三)孕期诊断

妇女在怀孕期间感染,或当孕妇免疫功能不全而先前的感染被激活(较少见),则将病原传染给胎儿,导致先天性弓形虫病。当二次感染基因型不同时,也可以发生先天性弓形虫病,正如最近描述的[7,42,70]。胎儿的传播率从妊娠前3个月的11%到最后3个月的90%,平均传播速率在30%~50%[13]。在法国和澳大利亚,阻断、诊断和治疗先天性弓形虫病的措施开始于对所有妇女在怀孕前或怀孕后不久强制性进行血清学试验之后。对所有孕妇采用这种管理方式的性价比在美国是有争议的,尽管模型提示这种模式可能是合算的。这个方法作为模型来管理怀孕的患者是有必要的[32,71-72]。

通常认为,怀孕前IgG抗体阳性,免疫功能正常的妇女,传播给胎儿的风险很小[28]。新的研究表明,感染第二种基因型的弓形虫偶尔会导致先天性传播。血清学阴性的妇女被认为具有感染风险,在法国怀孕期间每月都要进行IgG抗体检测。如果一个妇女在怀孕后第一次检测即为弓形虫特异性IgG抗体阳性,需要进一步检测IgG亲和力和不同的凝集试验(用丙酮固定或福尔马林固定的速殖子来检测)来确定是否是怀孕期间的急性感染[2,42](图141-3)。在怀孕的前12周,IgG高亲和力的检测结果基本可以排除怀孕期间的感染。IgG低亲和力的检测结果不能作为最近感染的指标,因为有些人感染后数月IgG抗体持续的低亲和力。孕妇急性感染的免疫诊断应该在干预前由弓形虫病参比实验室来证实[13,28,32,34,38,42]。

当孕妇已确诊急性弓形虫感染,则需要进行治疗,并对胎儿进行是否感染的检测。Daffos等[68]使用的策略包括:一旦确定孕妇急性感染,开始使用螺旋霉素进行治疗,并在怀孕的20~26周采集胎儿的血样和羊水进行检测(图141-4)。推荐羊水的PCR检测(从妊娠18周开始或更晚一些)是建立先天性弓形虫病宫内诊断的推荐检测[13,28,49,74-77]方法,因为胎儿血液取样检测不能提高诊断率,还会增加胎儿流产的风险。另外,胎儿的超声检查每2~4周进行1次,直到查出非特异性的感染指征:脑或肝钙化,脑积水,肝肿大和腹水。

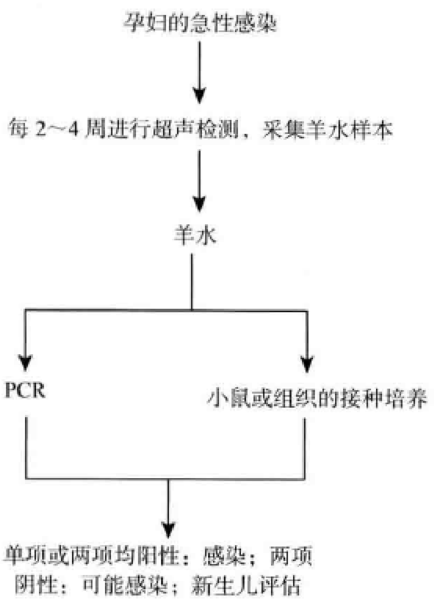


图141-4 先天性弓形虫病产前诊断示意图

如收集到了胎儿血液样本,应该进行弓形虫特异性IgG、IgM和IgA抗体的检测。凝集的血液应该接种到小鼠或组织培养细胞内,来鉴定寄生虫血症。应该对非特异性感染的指标,包括白细胞、嗜酸性粒细胞、血小板、总IgM、γ-谷氨酰转移酶和乳酸脱氢酶的水平进行评估[74]。大多数胎儿有一个或多个非特异性检测指标异常,最常见的是总IgM水平增高或γ-谷氨酰转移酶水平增

高[63,72,74,78]。检测到胎儿血清中弓形虫特异性 IgM 或 IgA 抗体，或是在胎儿白细胞中分离到寄生虫可以对胎儿感染确诊。

(四)新生儿的诊断

通过血清学试验、羊水的 PCR 检测和放射学试验来联合进行新生儿弓形虫感染的诊断[13,28,63,74,79-81]。如果血清学检查或胎儿超声检测显示是怀孕期间的急性感染，则应该用 PCR 方法进行羊水检测弓形虫 DNA(图 141-5)。羊膜穿刺术的首选时间是 18 周孕期或更晚，如果急性感染是在 18 周后确诊。新生儿的血清应该进行弓形虫特异性抗体 IgG、IgM 和 IgA 的检测。脑脊液(CSF)可以用来分析细胞、葡萄糖、蛋白、全 IgG 抗体、弓形虫特异性 IgG、IgM 抗体及进行弓形虫速殖子的直接检测。怀疑患有先天弓形虫病的新生儿，应该进行全身、神经、眼科检查和头部的计算机断层扫描(磁共振成像并不能证明钙化)。因为诊断需要几个月的时间来确认，临床医生在等待确认的同时，可能要根据早期指征、症状和血清学，对患者进行治疗。尽管先天性感染诊断复杂，需要使用多种昂贵的实验室检测，但早期诊断和治疗及非必需治疗所带来的成本，证明做出正确的诊断是有必要的。

相比较于母亲，通过 DT、IFA 试验检测婴儿 IgG 抗体水平持续或增加，和(或)弓形虫特异性 IgM 或 IgA 抗体阳性，可以诊断为先天性感染。用免疫印迹试验检测新生儿血清，检测到针对弓形虫表位的特异性 IgG 和 IgM 抗体，而这类抗体在母亲血清中没有检测到，也是先天性感染的证据[34-35,42,51,82]。

胎盘传递可偶尔导致新生儿 IgM 或 IgA 检测的假阳性。抗体检测为阳性通常需要进行重复验证，IgM 需要在出生后 2～4 天，IgA 检测需要在出生后 10 天进行重复。被动转移的母体 IgG 半衰期大约为 1 个月。母体的抗体在数月后仍可检测到，有报道显示在 1 岁后仍可检测到。未治疗的先天性感染的新生儿，在大约 3 个月内开始产生弓形虫特异性 IgG 抗体。感染的新生儿经治疗后，抗体会推迟到 9 个月产生，很少会完全阻止抗体产生。持续 IgG 阳性对于 1 岁以上的儿童是可以确认感染的。抗体负荷(弓形虫特异性 IgG 抗体除以总 IgG)的下降，证明有助于从胎儿抗体中区分出母体来源的抗体。

PCR 扩增检测脑脊液中刚地弓形虫的 DNA，或检测脑脊液中 IgM 抗体，或无外周血污染的脑脊液样本刚地弓形虫特异性 IgG 抗体产生，有助于确定先天性弓形虫病的诊断，计算方法是将体液中弓形虫特异性抗体滴度除以血清中弓形虫特异性抗体滴度的比值，乘以血清中丙种球蛋白浓度除以体液中丙种球蛋白浓度的比值，结果为 4 或是更高的，提示为显著的抗体反应。

美国正在进行一项长期的前瞻性研究，以确定先天性弓形虫病的最佳治疗方案[8,83]。临床医生可联系美国伊利诺伊州芝加哥大学附属医院的 Rima McLeod(电话，773-834-4152)，以治疗受感染儿童。

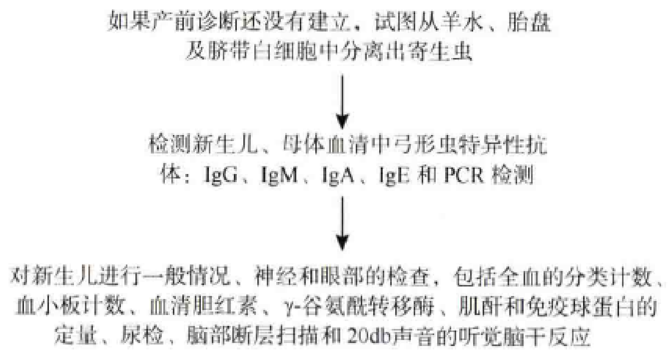


图 141-5 新生儿弓形虫病的诊断示意图

(五)眼部感染的诊断

急性感染和先天性感染可以导致弓形虫脉络膜视网膜炎[84-85]。先天性弓形虫病再激活致脉络膜视网膜炎的患者 IgG 水平一般较低，IgM 抗体阴性。相比之下，急性弓形虫病会导致活动性脉络膜视网膜炎，可以检测到 IgG 和 IgM 抗体。如果检测到人血清中弓形虫特异性 IgG 抗体伴随着眼部的损伤，说明局部抗体的产生，并在房水中检测到寄生虫的 DNA，可以确定为活动性眼型弓形虫病[2,21,24,86]。当用上述公式来计算眼液或血清中获得的结果，值≥8 则为急性眼型弓形虫病。如果血清中 DT 的滴度≥1∶1000，通常不可能用于计算局部抗体的含量。

(六)免疫缺陷宿主的诊断

各种免疫抑制宿主，包括血液及实体器官移植受者、自身免疫性疾病患者，可发生严重的

甚至是致命的弓形虫病。疾病通常是激活了潜在感染，尽管报道有广泛的临床表现，但常涉及中枢神经系统。这些患者的诊断可非常困难，因为IgM抗体通常检测不到，而IgG抗体只能证实慢性感染的存在。由于缺乏急性感染的血清学证据，通过组织活检或生物组织学、细胞中DNA的复制可以确诊，通过外周血、羊水、脑脊液、支气管肺泡灌洗液、房水或心肌组织进行PCR扩增，检测刚地弓形虫的DNA，排除潜伏感染的可能。

人接受器官或骨髓移植，移植前进行弓形虫特异性IgG抗体的检测，可以确定免疫状态。如果在移植前血清为阴性，有急性获得性感染的风险，如果在移植前血清为阳性，有激活潜在感染的风险[2,87]。那些急性获得性感染的患者通常可检测到弓形虫特异性IgG和IgM抗体，而那些激活潜在感染的患者通常检测不到弓形虫特异性IgM抗体。连续检测外周血的弓形虫DNA的PCR方法已经被作为血清学补充试验，来监测骨髓移植患者弓形虫病的发展[22-23]。血清学阴性的心脏移植受者，从血清学阳性的供者获得器官移植，可以发生弓形虫性心肌炎，类似器官的排斥反应。

弓形虫脑炎是艾滋病患者最常见的中枢神经系统机会性感染，如果不及时治疗，将是致命的。在美国1992—1997年死于艾滋病的患者中，在他们艾滋病的病程中，7.2%发展成弓形虫脑炎[11,88]。建议所有HIV感染者在确定HIV感染后都检测一下弓形虫特异性IgG抗体，以发现潜在感染[11,88]。如果弓形虫血清学阳性，有症状的患者且$CD4^+$ T淋巴细胞计数<100/μl的，应该给予治疗。大部分有弓形虫脑炎的艾滋病患者，体内可检测到抗弓形虫的IgG抗体。然而，大约有3%的有弓形虫脑炎的艾滋病患者，血清中没有检测到弓形虫特异性的抗体。如果有条件可进行腰椎穿刺，PCR检测弓形虫DNA。脑脊液可用来检测EB病毒、巨细胞病毒和JC病毒，其分别引起原发性中枢神经系统淋巴瘤、巨细胞病毒脑室炎、进行性多灶性白质脑病，这些病毒是鉴别诊断的一部分。脑脊液中发现有弓形虫特异性的IgG抗体的艾滋病患者，已被证明患有弓形虫脑炎[34-35]。当上述新生儿弓形虫病用的公式结果大于1时，提示有显著的抗体产生。

十一、治疗

一般来说，医生治疗4种弓形虫感染的患者：①急性感染的孕妇，防止胎儿的感染[13,32,72-73,81,89-90]；②婴儿的先天性感染[13,79,83,91-93]；③免疫抑制的人，通常引起潜在感染的激活[11,22-23,34,88,94-96]；④急性感染的患者伴随眼部疾病的复发[84-85,97-100]。HIV感染的患者，药物用于预防性或控制性治疗弓形虫病[11,88]。目前推荐的药物对分裂的速殖子有效，但不能根除囊内的病原体（缓殖子）。

用于治疗先天性弓形虫病最常见的药物组合由乙嘧啶和磺胺类药（美国推荐磺胺嘧啶），外加叶酸构成。叶酸（以甲酰四氢叶酸钙形式）用于对抗乙胺嘧啶对骨髓的毒性效应。乙胺嘧啶抑制二氢叶酸还原酶，这个酶对叶酸的合成非常重要，并产生可逆的骨髓抑制反应。磺胺类药抑制二氢叶酸的合成，在叶酸合成中也非常重要。这2种药发挥抗刚地弓形虫的协同效应。由于其对早期妊娠有毒性效应，通常是建议孕妇在≥18周妊娠使用乙胺嘧啶和磺胺嘧啶治疗[42,65]。18周后，如果通过羊膜穿刺或脐静脉穿刺确认了胎儿感染，可以给予乙胺嘧啶和磺胺嘧啶进行治疗。如果孕妇急性感染弓形虫病而胎儿的感染没有确定，推荐使用螺旋霉素[可以通过FDA获得，电话(301)796-0563或(301)796-1400，如果无人接听，可拨(301)796-3763]，该药物可阻断刚地弓形虫从母亲传给胎儿[42,65]。

治疗孕妇急性感染的随机前瞻性研究还未开始实施。一些研究者已经质疑或不能明确孕期的治疗对于阻止先天性感染[81,101]或对婴儿后遗症[101]的有效性。缺乏证据的假设是刚地弓形虫速殖子在感染的几天内就转变为缓殖子，很可能伴随着血清和细胞介导的反应[101]。因此，当检测到孕妇感染时，速殖子已传播到胎儿，造成伤害，并转变为包囊内的缓殖子，对治疗没有反应。然而，一项多中心机构的观察研究发现，在孕期治疗急性弓形虫感染与婴儿后遗症减少相关，但不能减少母婴传播[68]。乙胺嘧啶和磺胺嘧啶（加上甲酰四氢叶酸）药物用于治疗胎儿先天性弓形虫病，与其他曾经用的控制措施相比，可以改善胎儿感染的结果[42,83]。

在弓形虫病免疫抑制的人群，乙胺嘧啶和磺

胺嘧啶加甲酰四氢叶酸的方案是首选的治疗方法[11,34,65,88]。克林霉素是替代的二线药物，可与乙胺嘧啶和甲酰四氢叶酸联用，用于不能耐受磺胺类药物的患者[11,65,88,96,102]。甲酰四氢叶酸可防止乙胺嘧啶治疗引起的血液毒性。阿托伐醌与乙胺嘧啶或磺胺嘧啶联用对一些不太严重的成人患者有很好的疗效[65,103]。在系统性弓形虫病的治疗中，其他药物的作用尚无对照实验确定。一般来说，替代药物，如阿奇霉素、克拉霉素和氨苯砜，应该与另一种药物结合使用，最好是乙胺嘧啶[33]。

因为复发常常发生在艾滋病感染的弓形虫病患者，建议乙胺嘧啶＋磺胺嘧啶（首选）或乙胺嘧啶＋克林霉素（替代）维持治疗（二级预防）[10,87]。如果患者已完成初级治疗，并且没有弓形虫病引起的症状和体征，对抗病毒治疗具有较高的反应性，$CD4^+$ T 细胞计数在 6 个月内持续增加，200 个细胞/μl，可以停止弓形虫的二级预防。对于弓形虫血清学阳性的患者，$CD4^+$ T 细胞计数少于 100 个/μl，为了预防弓形虫病的发作，推荐使用甲氧苄氨嘧啶-磺胺甲嘿唑作为第一选择，氨苯砜加乙嘧啶或阿托伐醌加或不加乙胺嘧啶作为第二选择。所有方案中都有甲酰四氢叶酸，包括乙胺嘧啶[11,88]。

乙胺嘧啶和磺胺嘧啶通常用于眼弓形虫病治疗[85]。克林霉素联合其他抗微生物药物，也常用于眼弓形虫病的治疗[98]。许多新药也被尝试着治疗眼弓形虫病，包括阿托伐醌[104]、利福布汀、阿奇霉素和克拉霉素[100]。除了抗微生物药物，医生可增加糖皮质激素减少眼部炎症。然而，最佳的治疗眼弓形虫病的方案有待对照实验来确定。

参考文献请扫二维码查阅

第 142 章　致病性和机会致病性自生生活阿米巴

JENNIFER R. COPE, IBNE KARIM M. ALI, GOVINDA S. VISVESVARA

（梁宏洁　译；曹建平　审校）

自生生活的阿米巴包括耐格里属（*Naegleria*）、棘阿米巴属（*Acanthamoeba*）和巴拉姆希属（*Balamuthia*），可以感染人类和其他动物，可能导致严重感染并危及生命。这些阿米巴中，耐格里属中的福氏耐格里阿米巴（*Naegleria fowleri*）、棘阿米巴属中的多种[如卡希利棘阿米巴（*Acanthamoeba castellanii*）、卡伯德森棘阿米巴（*A. culbertsoni*）、哈氏棘阿米巴（*A. hatchetti*）、希利棘阿米巴（*A. healyi*）、多噬棘阿米巴（*A. polyphaga*）、条脊棘阿米巴（*A. rhysodes*）、阿斯特罗尼棘阿米巴（*A. astronyxis*）、豆状棘阿米巴（*A. lenticulata*）、第戎棘阿米巴（*A. divionensis*）]及巴拉姆希阿米巴属中的狒狒巴拉姆希阿米巴（*Balamuthia mandrillaris*），可引起中枢神经系统疾病[1-2]，棘阿米巴还可引起人角膜感染，即棘阿米巴角膜炎[3]。此外，棘阿米巴和狒狒巴拉姆希阿米巴还可引起人类皮肤感染[4]。由 *Sappinia pedata* 和弗朗辛副瓦变形虫（*Paravahlkampfia francinae*）引起的感染也有个案报道[5-7]。

这些自生生活阿米巴作为人类病原体，最早是由 Culbertson 及其同事提出。他们从被认为含有未知病毒的组织培养基中分离出棘阿米巴 A-1（现命名为卡伯德森棘阿米巴）[8]；他们还发现脑内接种该阿米巴后 1 周内死亡的小鼠和猴的脑部病变处有阿米巴存在，Culbertson 等认为在自然界中也可发生类似的感染。1965 年 Fowler 和 Carter 首次报道了澳大利亚 1 例由福氏耐格里阿米巴引起的脑部感染患者死亡病例[9]。

一、分类

截至目前，传统的分类主要基于形态学、生态学和生理学的标准。根据这个分类方法，棘阿米巴、巴拉姆希阿米巴和其他一些阿米巴，包括自生生活阿米巴[如哈门阿米巴（*Hartmannella*）、简变虫（*Vahlkampfia*）和蒲变虫（*Vannella*）]和寄生性阿米巴（如内阿米巴属），分类为原生动物门、肉足亚门、根足总纲、叶足纲及阿米巴目；耐格里阿米巴分类为异叶足纲（class Heterolobosea）、裂芡目（order Schizopyrenida）、简变虫科（family Vahlkampfiidae）；匀变虫属（*Sappinia*）分类为叶足纲（Lobosea）、真变形目（order Euamoebida）、甲变虫科（family Thecamoebidae）。最新的分类方法根据形态学、生化途径及分子系统发育进行，取代了传统的界、门、纲、亚纲、总目、目的分类方法。根据新的分类方法，真核细胞生物分为 6 个群（clusters）或超群（supergroups），称为变形虫界（Amoebozoa）、后鞭毛生物（Opisthokonta）、有孔虫界（Rhizaria）、泛植物界（Archaeplastida）、囊泡藻界（Chromalveolata）、古虫界（Excavata）。棘阿米巴和巴拉姆希阿米巴归为变形虫界、棘阿米巴科；匀变虫属（*Sappinia*）归为变形虫界、Flabellinea、甲变虫科（Thecamoebidae）；福氏耐格里阿米巴归为古虫界、异叶足纲（Heterolobosea）、简变虫科（Vahlkampfiidae）[10]。原生生物学家支持该分类方法，但同时其他分类系统也还在应用，有关寄生虫分类学的进一步信息请参阅第 135 章。

二、病原体特征

（一）棘阿米巴

棘阿米巴的生活史有 2 个阶段，一个是摄食和繁殖阶段，称为滋养体，另一个是包囊（休眠、有

抵抗力的阶段)。滋养体长 15～45 μm,从细胞体表面产生锥形、透明的棘状伪足(图 142-5)。滋养体为单核,双核滋养体也可偶尔出现;核的中央位置是浓缩的大核仁。阿米巴滋养体以大肠埃希菌或其他革兰阴性菌为食,以二分裂方式繁殖。在细胞分裂过程中,细胞核进行有丝分裂,核仁和核膜消失。棘阿米巴没有鞭毛期,但产生一个双层囊壁的包囊(10～25 μm)(图 142-6),外壁有皱褶(外囊),内壁呈星形、多边形甚至圆形(内囊)[11]。包囊可抵抗各种物理及化学环境压力,包括干燥[12]。

棘阿米巴曾根据大小和形态分为 3 组,这种形态特征会随着环境压力和培养条件的改变而发生变化。因 18S rRNA 基因有多个拷贝并且进化稳定,其序列分析可用于棘阿米巴感染的分类和诊断,根据棘阿米巴物种之间和同一物种内部有大量与形态特征相关的序列变异,将其分为 20 个基因型,即 T1～T20 基因型[13-16]。

(二)耐格里阿米巴

福氏耐格里阿米巴生命周期中有 3 个阶段:滋养体、鞭毛体及包囊。滋养体是一个小的、蛞蝓样虫体,长 10～25 μm,通过产生光滑的半球形凸起以形成突发的移动,其后端称尾状体,有黏性,通常有几根拖尾的细丝,细胞核为单核,大而稠密的核仁位于中央。福氏耐格里阿米巴以大肠埃希菌或其他革兰阴性菌为食,通过二分裂方式进行繁殖;在细胞分裂过程中,细胞核通过有丝分裂进行分裂,核仁伸长并分裂为两个极体,核膜持续存在,在这个阶段,由于环境条件的改变,可形成一个短暂的梨形双鞭毛体及光滑的包囊(图 142-1 至图 142-4)。包囊通常为球形,直径 7～15 μm,囊壁可能有一个或多个孔被黏液样物质堵塞[1]。

(三)巴拉姆希阿米巴

巴拉姆希阿米巴滋养体形态普遍不规则,有些可能像蛞蝓,滋养体为单核,偶见双核,一个大核仁位于细胞核中央,有时候,特别是在组织切片上巴拉姆希阿米巴可能有一个以上的核仁。细胞核进行有丝分裂,末期核膜破坏,核仁最终消失。与棘阿米巴和福氏耐格里阿米巴不同的是巴拉姆希阿米巴并不以细菌为食,在实验室中,它以哺乳动物组织培养细胞为食,如猴肾细胞、人肺成纤维细胞和人脑微血管内皮细胞。虫体长12～60 μm,平均长度为 30 μm (图 142-7)。无论是在无菌培养基中,还是在组织细胞培养时,巴拉姆希阿米巴滋养体都能产生宽大的伪足,无明显的运动;当组织培养细胞失效时,滋养体可产生指状伪足,以类似蜘蛛爬行的方式移动[17]。与棘阿米巴相似,巴拉姆希阿米巴没有鞭毛体阶段,包囊通常为单核、球形,直径 6～30 μm(图 142-8)。光学显微镜下,包囊外壁呈不规则小波浪状,内壁呈圆形,成熟包囊中常可见一层紧贴内囊壁的折光颗粒;电子显微镜下,囊壁由 3 层组成:薄而不规则排列的外囊、厚而电子密度高的内囊及无定形的中间囊层[17-18]。

三、流行病学

1965 年,澳大利亚首次报道了福氏耐格里阿米巴感染,目前全球大部分地区都已发现该类型感染。早在 1931 年,美国已报道了原发性阿米巴脑膜脑炎(PAM)病例,1962－2015 年,美国共报道了 138 例 PAM,每年为 0～8 例[19]。一般情况下,PAM 主要发生于夏季水温升高时频繁在湖中或河水中潜水跳水的年轻男性,尤其是美国南部地区。如果采取适当措施,如捏住鼻子或使用鼻夹、游泳时避免挑起底部沉积物、避免在淡水湖泊等水体进行运动,减少水进入鼻腔,可能会减少感染风险[20]。最近在美国北部地区如明尼苏达[21]、堪萨斯、印第安纳和马里兰等地 PAM 也有报道,表明福氏耐格里阿米巴感染的地理范围正在改变。如果气候变化使环境水温升高,可能导致福氏耐格里阿米巴分布范围扩大[21]。PAM 病例也与使用自来水进行鼻腔鼻窦冲洗有关[22-24],使用煮沸过的水、无菌水或过滤水冲洗鼻腔可防止福氏耐格里阿米巴感染。

全球多个地区已报道发生棘阿米巴和巴拉姆希阿米巴感染,感染与季节无关。棘阿米巴感染主要发生在免疫缺陷者中,如艾滋病患者、癌症或器官移植患者[25-27],而巴拉姆希阿米巴可感染免疫缺陷者和免疫力正常者[28-29],最近狒狒巴拉姆希阿米巴被确定为实体器官移植受者脑炎的病原体[30-31]。据报道,拉丁裔美国人狒狒巴拉姆希阿米巴感染率较高,是因环境因素、遗传倾向、有限的医疗条件还是其他社会经济因素和压力造成,目前还不清楚[32]。

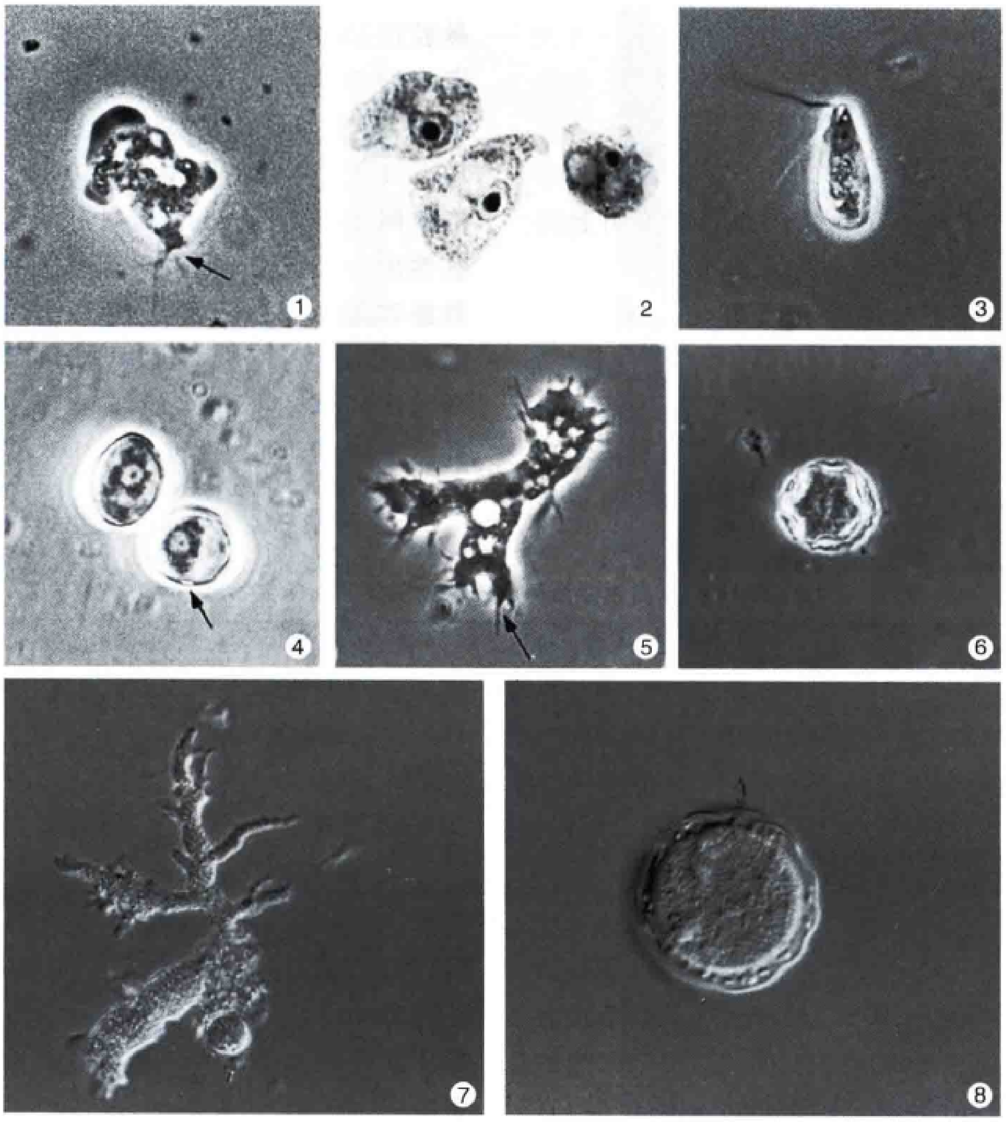


图 142-1～图 142-4 福氏耐格里阿米巴

注：1. 滋养体，相差显微镜所示（箭头示尾状体和丝状物）；2. 滋养体，三色染色；3. 双鞭毛体，相差显微镜所示；4. 有光滑囊壁的包囊，相差显微镜所示（箭头示小孔），放大倍数，约×835

图 142-5～图 142-6 卡氏棘阿米巴

注：5. 滋养体，相差显微镜所示（箭头示棘足）；6. 双层囊壁的包囊，相差显微镜所示，放大倍数，约×835

图 142-7～图 142-8 狒狒巴拉姆希阿米巴

注：7. 滋养体，相差显微镜所示；8. 包囊，相差显微镜所示。放大倍数，约×1140

福氏耐格里阿米巴和棘阿米巴通常存在于土壤、淡水、污水、污泥甚至空气中的灰尘中。从微咸水、海水、耳分泌物、肺分泌物、鼻咽黏膜标本、上颌窦标本、下颌自体移植物和粪便标本中也分离出多种棘阿米巴。这些阿米巴通常以细菌为食，属于自生生活阿米巴。棘阿米巴也被认为是军团菌、鸟分枝杆菌和其他致病菌的宿主，如单核细胞增生李斯特菌、类鼻疽伯克霍尔德菌、霍乱弧菌和大肠埃希菌 O157 血清型，意味着对公共卫生的影响可能会扩大[33-34]。此外，多噬棘阿米巴纯培养物可用于从临床标本如痰、肝和肺脓肿甚至粪便中分离嗜肺军团菌[35]、不同军团菌[36]和脓肿分枝杆菌马赛亚种[37]。专性细胞内病原体如衣原体属、嗜衣原体属、类衣原体样细菌在棘阿米巴属中分离比例可达5%，呼吸道病原体如肺炎衣原体可以在棘阿米巴中生长[33]，棘阿米巴是否胞内共生细菌（其中一些细菌是人类潜在的病原体）的宿主尚不得而知。

尽管已经从土壤、灰尘和水中分离出狒狒巴拉姆希阿米巴[38-41]，并在环境中发现其 DNA[42]，但对其环境生态地位及摄食习性仍知之甚少，目

前认为其习性与棘阿米巴和耐格里阿米巴很相似，以小阿米巴和鞭毛虫为食[43]。

四、临床表现

表 142-1 列出了自生生活阿米巴感染引起的临床症状。

(一)耐格里阿米巴脑膜脑炎

1966 年，Butt[44]报道了美国首例由福氏耐格里阿米巴引起的中枢神经系统感染，命名为原发性阿米巴脑膜脑炎(PAM)。PAM 是一种急性暴发性疾病，通常发生在以往健康而近期鼻腔接触过淡水的儿童和年轻人中，感染潜伏期平均为 5 天(1～9 天)[45]，临床特征为头痛、发热、颈部僵硬、畏光和昏迷，在出现症状后平均 5.3 天(1～18 天)内死亡[45]。水中的福氏耐格里阿米巴进入鼻腔，通过筛板进入嗅叶，引起急性出血性坏死，损害嗅球及大脑皮质，只有少数患者能够幸存。到目前为止，美国仅有 4 名记载的幸存者[46]。通过尸体解剖，发现大量阿米巴滋养体散布在脑组织中，其中许多滋养体吞噬了红细胞和脑组织(图 142-9)。

表 142-1 自生生活阿米巴感染引起的临床症状

种类	神经系统临床症状	其他临床症状
棘阿米巴	慢性肉芽肿性阿米巴脑炎(GAE)	播散性皮肤损害，鼻窦炎，骨髓炎，肺炎，角膜炎
狒狒巴拉姆希阿米巴	慢性肉芽肿性阿米巴脑炎(GAE)	皮肤损害
福氏耐格里阿米巴	原发性阿米巴脑膜脑炎(PAM)	无报道
Sappinia pedata	脑炎(1 例)	无报道
弗朗辛副瓦变形虫	脑膜脑炎(1 例)	无报道

福氏耐格里阿米巴通过产生食物杯或质膜凹陷形成小窝(amebostomes)，以及通过依赖于接触的细胞溶解[可能由热稳定的溶血蛋白、不耐热的溶血素和(或)磷脂酶组成的多组分系统介导]直接侵蚀脑组织[47]，脑组织中福氏耐格里阿米巴包囊不常见。曾经认为福氏耐格里阿米巴只感染人类，直到 1997 年报道了第一例南美貘因 PAM 导致死亡，表明 PAM 可以发生在动物身上[48]。此外，有报道称荷斯坦奶牛 PAM 死亡案例与饮用地表水有关，提示动物体内的 PAM 可能比目前了解的更为常见[49]。

(二)棘阿米巴脑炎和其他临床表现

已知多种棘阿米巴可引起慢性肉芽肿性阿米巴脑炎(GAE)，其症状是头痛、意识不清、头晕、嗜睡、癫痫，有时出现偏瘫，受损最严重的是大脑半球，常有水肿、广泛的出血性坏死，累及颞叶、顶叶和枕叶，阿米巴滋养体和包囊通常散布于整个脑组织。大量血管中有纤维蛋白样坏死形成的血栓，周围环绕着分叶核白细胞、滋养体和包囊(图 142-10)。免疫功能正常患者体内可见多核巨细胞形成的肉芽肿。一些患者出现慢性溃疡性皮损、脓肿或红斑结节[50]；棘阿米巴感染的其他表现包括鼻窦炎、骨髓炎和肺炎[26,50-51]。棘阿米巴感染下呼吸道或皮肤后通过血流播散侵犯中枢神经系统[1]。人类、大猩猩、猴子、狗、绵羊、牛、马和袋鼠均可发生棘阿米巴中枢神经系统感染[1]。

(三)巴拉姆希阿米巴(细胶丝阿米巴)脑炎

狒狒巴拉姆希阿米巴 GAE 与棘阿米巴 GAE 的病理及发病机制相似，中枢神经系统组织中均可发现滋养体和包囊(图 142-11)，它们的大小与棘阿米巴滋养体和包囊相同，因此光学显微镜下很难区分组织切片中的这 2 种阿米巴。一些切片中巴拉姆希阿米巴滋养体的细胞核有多个核仁(图 142-11)，而棘阿米巴滋养体只有一个核仁，此时可以根据核的形态来进行区分，在大多数情况下需通过免疫组织化学技术和分子检测来确定巴拉姆希阿米巴类型。巴拉姆希阿米巴与棘阿米巴的抗原不同，通过免疫荧光或其他免疫化学方法很容易进行区分(图 142-12)[17-18,52]。目前，已知由狒狒巴拉姆希阿米巴引起的中枢神经系统感染可导致许多灵长类动物(包括大猩猩、长臂猿、狒狒、猩猩、猴子、狗、羊和马)死亡[1,53]。

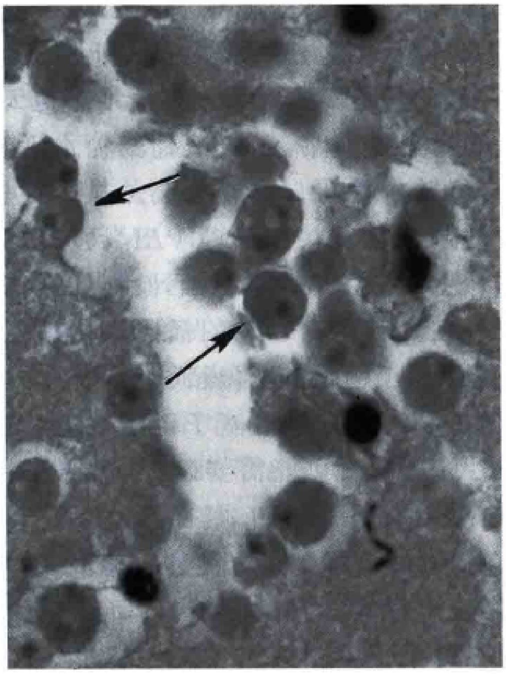


图 142-9　CNS 组织切片中大量的福氏耐格里阿米巴滋养体(箭)，显示广泛脑组织坏死。放大倍数，约×564，见彩插

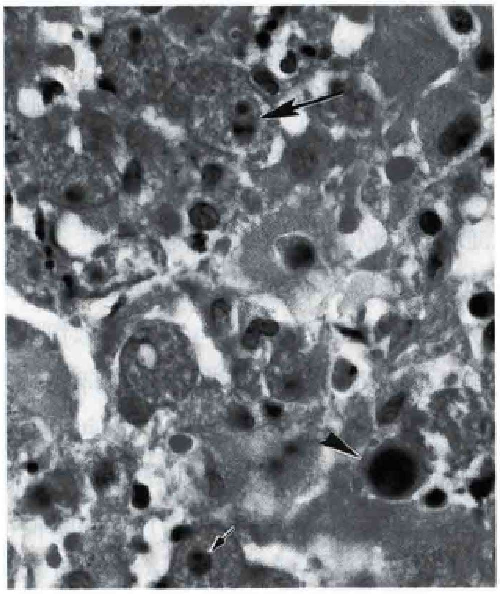


图 142-11　GAE 患者的脑组织切片显示狒狒巴拉姆希阿米巴滋养体和包囊(箭头)。注意滋养体核内有 2 个核仁(短箭)和 3 个核仁(长箭)。放大倍数，约×413，见彩插

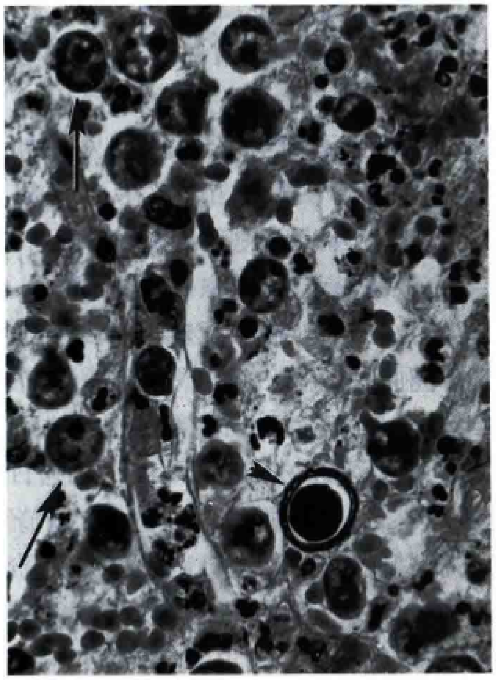


图 142-10　GAE 患者的 CNS 组织切片显示血管周围的卡伯德森棘阿米巴滋养体(箭)和包囊(箭头)。放大倍数，约×489，见彩插

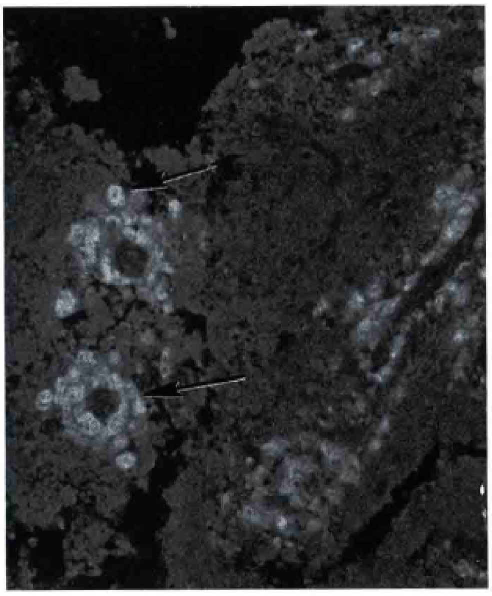


图 142-12　GAE 患者的脑组织切片显示狒狒巴拉姆希阿米巴免疫荧光位点。注意血管周围发荧光的阿米巴(箭)。放大倍数，约×188，见彩插

(四)棘阿米巴角膜炎

棘阿米巴感染可导致影响视力的棘阿米巴角膜炎，如果未能及时治疗，可能会导致角膜溃疡、视力下降、失明和眼球摘除[3,50]。棘阿米巴角膜炎的症状是剧烈眼痛，环形或弧形基质层浸润、复发性角膜上皮损伤，常用的眼科抗菌药物治疗无效。早期棘阿米巴角膜炎常被误诊为单纯疱疹病毒角膜炎，因为单纯疱疹病毒角膜炎常见不规则上皮病变、基质浸润性角膜炎和水肿[3,54]，难以愈合的角膜溃疡通常提示棘阿米巴角膜炎。

1973年，美国报道了首例棘阿米巴角膜炎，患者是得克萨斯州南部的一名牧场人员，他的右眼有外伤史[55]，在他的角膜分泌物镜检、角膜刮取物及活检标本培养中多次查见多噬棘阿米巴滋养体和包囊。1973—1986年7月，美国疾病控制预防中心(CDC)共收到208例诊断报告[56]。1973—1984年期间病例数逐渐增加，1985年起急剧上升。1985—1986年进行的一项病例对照研究[56]表明，佩戴隐形眼镜(尤其是日戴型和长戴型)是主要危险因素。使用自制盐水者比使用商业化清洁液者的棘阿米巴角膜炎发生率明显增高(78%和30%)；消毒镜片次数明显少于厂商推荐者易被感染(72%和32%)；戴隐形眼镜游泳者更易感染(63%和30%)。美国疾病预防控制中心进行了一项病例对照研究，调查了2004—2007年间棘阿米巴角膜炎病例的增加情况，结果显示，病例数量的增加与使用一种特殊的多用途隐形眼镜溶液有关[57]。此外，另一项研究显示，在美国市场上销售的大多数隐形眼镜护理液对棘阿米巴没有足够的消毒活性[58]。最近对棘阿米巴角膜炎的病例对照研究表明，佩戴隐形眼镜的不良卫生习惯，如容器中消毒液太满、戴隐形眼镜睡觉、把隐形眼镜放在水里等，都可导致感染[59-60]。

五、标本的采集、处理和储存

分离福氏耐格里阿米巴需在无菌操作下获取脑脊液(CSF)和脑组织(尤其是鼻嗅球周围)；分离棘阿米巴和巴拉姆希阿米巴需在无菌操作下获取脑组织、肺组织及溃疡的皮肤组织，在脑脊液中不易发现；棘阿米巴角膜炎患者需在无菌操作下进行角膜刮片或角膜组织活检。标本应室温保存(24～28℃)，如果要分离培养则不能冷冻。组织标本应保存在10%福尔马林中性缓冲液中，以便进行组织学检查[52]，冷冻的脑脊液或组织标本可用于分子检测。处理标本的人员必须采取适当的预防措施，如穿实验服、戴手套和护目镜，并在生物安全柜中进行操作。

六、临床和实验室诊断

1. 直接检查 PAM与化脓性或细菌性脑膜炎的临床特征不易鉴别。将标本直接湿片镜检是鉴别诊断PAM的重要方法。PAM患者脑脊液细胞增多，尤其是多核白细胞显著增多但无细菌，脑脊液压力可能升高，脑脊液葡萄糖水平正常或略有下降，脑脊液蛋白水平升高。显微镜检查脑脊液中的阿米巴可快速诊断PAM。应由病理学专家或微生物学家在显微镜下检查脑脊液，以确定是否存在具有定向运动的福氏耐格里阿米巴。因阿米巴易于贴附在容器表面，制片时要轻轻摇动容器，将一滴标本悬液滴于干净载玻片上并盖上盖玻片。脑脊液可能需要以500×g的速度离心5 min，以浓缩阿米巴。样品离心后，小心地吸去大部分上清液，将剩余沉淀物轻轻混匀，制备湿片，显微镜下观察。在脑脊液涂片上进行吉姆萨染色或三色染色观察阿米巴细胞核形态，以排除宿主巨噬细胞缓慢运动而导致的假阳性。玻片在10倍及40倍物镜的显微镜下观察，最好用相差显微镜。如果用常规亮度的光线，则应在暗视野下观察玻片。玻片可加温至35℃(以促进阿米巴运动)，若有阿米巴，尤其是福氏耐格里阿米巴，很容易发现其主动定向运动，有时可见到2根鞭毛的鞭毛体。

2. 永久染色标本的制备 取一小滴脑脊液沉淀或其他样本置于载玻片中央，在37℃湿盒中放置5～10 min，使阿米巴附着于玻片表面。将37℃的绍丁固定液直接滴几滴在样品上，静置1 min，然后将载玻片转移到装有固定液的染色缸中1h，可以用惠特利氏三色染色法或海登汉氏苏木素铁染色法染色。涂布在显微镜载玻片上的角膜刮屑可用甲醇固定，用Hemacolor染色试剂(Harleco, EM Industries, Inc.)进行染色[1,61]。脑脊液也可以通过细胞离心，瑞氏-吉姆萨染色，根据细胞核形态鉴别阿米巴，阳性结果应立即报告临床医生，以便及时进行治疗，这对由福氏耐格里阿米巴导致的PAM尤为重要。革兰染色不能检测阿米巴，因为它也能使宿主细胞染色，假阳性结果可导致误诊误治。最近的一份报告表明福氏耐格里阿米巴可能发生中枢神经系统外播散，因此可能通过器官移植造成PAM传播[62]。一些研究表明感染狒狒巴拉姆希阿米巴的实体器官移植供体将其传播给受体导致感染[30-31]，强调正确及时的诊断很重要。

3. 抗原检测 致病性福氏耐格里阿米巴和其

他非致病性耐格里阿米巴在营养阶段通过形态学难以区分，因其抗原有所不同，通过凝胶扩散、免疫电泳、免疫荧光技术、同工酶等技术可鉴定培养分离出的阿米巴[1,61]，与此相似，不同种类的棘阿米巴中也存在抗原差异[50,63]。另外，福氏耐格里阿米巴、棘阿米巴和狒狒巴拉姆希阿米巴可用组织化学方法进行区分[1,21,29-30,52,62,64-65]，目前还没有商业化的抗原检测试剂盒。

4. 临床标本核酸检测　目前已从环境、角膜、泪液、大脑和肺组织中检测到棘阿米巴基因。许多研究通过常规 PCR 和 Sanger 测序（测序法）分析了棘阿米巴的线粒体 DNA 和 18S rRNA 基因，以了解棘阿米巴种内、种间的多样性和系统发育[1,50,61]。然而只有少数研究使用这些技术鉴别棘阿米巴角膜炎或棘阿米巴 GAE[13-14,61,64,66-67]，这可能是由于商业试剂缺乏所致。

对于棘阿米巴的检测，Booton 等[13]使用 rDNA 测序和属特异性引物 JDP1（5′-GGCCCAGATCGTTTACCGTGAA-3′）及 JDP2（5′-TCTCACAAGCTGCTAGGGGAGTCA-3′），扩增了小亚基 rDNA 的区域，通过序列分析进行棘阿米巴基因型的鉴别。

目前对巴拉姆希阿米巴的研究都是基于 18S rRNA 基因测序[68]，结果似乎相同。有研究使用 PCR 方法对狒狒巴拉姆希阿米巴进行检测[69]，也有报道用 PCR 方法对福尔马林固定的组织标本中狒狒巴拉姆希阿米巴进行检测[70]，尽管福氏耐格里阿米巴细胞核 18S rRNA 序列相似，但转录间隔区（ITS）序列有变异，可区别 6 种不同基因型（Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ、Ⅳ、Ⅴ、Ⅵ）[71]，在北美人群中只有 3 种基因型（Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ）流行[72]。5.8S rRNA 基因和 ITS1、ITS2 基因序列可鉴别福氏耐格里阿米巴、其他耐格里阿米巴、副瓦变形虫，并可分析福氏耐格里阿米巴基因型[7,22,68,71-72]。最近研究表明，使用 6 个微卫星标记可在福氏耐格里阿米巴菌株分型方面比 5.8S rRNA 基因和 ITS1、ITS2 分辨率更高[73]。最近发现的福氏耐格里阿米巴的基因组[74-75]有助于阐明致病机制，开发更好的靶向药物，帮助感染致死病原体的患者提高生存率。

CDC 开发的实时多重 PCR 方法可鉴别脑脊液和活检组织标本中的棘阿米巴、巴拉姆希阿米巴及福氏耐格里阿米巴[68]，PCR 引物和 TaqMan 探针的目的基因是 18S rRNA 的 3 个区域。实时多重 PCR 是快速、敏感、有效的检测手段，可在单一标本中检测出这 3 种致病性自生生活阿米巴，较传统 PCR 有所改进。美国疾病预防控制中心使用这种检测手段成功鉴别棘阿米巴、巴拉姆希阿米巴和福氏耐格里阿米巴，由于其敏感性和特异性高，当标本中有一个阿米巴原虫时即可检出。但是，由于缺少商业化试剂，这些检测技术并不能在临床实验室中常规开展。

七、分离

从生物标本中分离致病性自生生活阿米巴的操作步骤推荐如下，无营养性琼脂平板法仅适用于培养棘阿米巴和耐格里阿米巴。

（一）材料

1. Page 阿米巴生理盐水[11]：临床实验室常规的生理盐水或磷酸盐缓冲液不适用于阿米巴分离，因其溶液的氯化钠浓度阻碍阿米巴尤其是福氏耐格里阿米巴的生长。

2. 含有 1.5% Difco 琼脂的培养平板：用 Page 阿米巴盐水配制的无营养性琼脂平板[11]，4℃条件下，这些平板最长可保存 3 个月。有时也可选择巧克力血琼脂平板、胰蛋白酶大豆琼脂平板、Lowenstein-Jensen 琼脂平板，但这些平板并不适合混合有细菌的阿米巴标本，因为平板上的细菌可能会过度生长或阻止阿米巴生长，或者不易观察，尤其是阿米巴数量较少的时候。

3. 培养 18～24 h 的大肠埃希菌或产气肠杆菌（产气克雷伯菌）。

（二）琼脂平板的准备

1. 从冰箱中取出平板，置于 37℃孵育箱中 30 min。

2. 在生长有大肠埃希菌或产气肠杆菌的普通培养斜面上加入 0.5 ml 阿米巴盐水溶液，用无菌接种环轻轻涂抹斜面表面（不要破坏琼脂表面），用无菌巴氏移液管轻轻使细菌均匀悬浮，加 2～3 滴悬浮液于 37℃预热的琼脂平板表面中央，用接种环将细菌涂抹在琼脂表面备用。

（三）标本接种

1. 对脑脊液标本，以 500×g 离心 5～8 min，用无菌巴氏移液管小心地将所有上清液（但仍留

0.5 ml)移至无菌试管,4℃储存备用。将残余的液体及沉淀混匀,用巴氏移液管滴2～3滴在预铺细菌的琼脂板中央,37℃孵育培养。

2. 对组织标本,取少量阿米巴盐水将小块组织捣碎,然后用无菌巴氏管吸取2～3滴混合物,滴于琼脂板中央。CNS和肺组织标本置于37℃、其他部位组织标本置于30℃孵育培养(如皮肤和角膜)。

3. 水和土壤标本分别按脑脊液和组织标本同样进行处理。

4. 为便于比较,建议做培养对照,但应注意防止与患者培养物的交叉污染。

(四)平板检查

1. 每天用低倍镜(×10)观察平板寻找阿米巴,连续7天,最早可在第一天观察到阿米巴。

2. 如观察到阿米巴,即用蜡笔圈出,用小刀从圈中切出一小片琼脂,将琼脂面朝下接种至新的预铺过细菌的琼脂平板表面,继续按上述方法培养。用这种方法,棘阿米巴和福氏耐格里阿米巴都容易培养,定期转种可长期保存病原体。显微镜检培养皿时,可看到阿米巴呈小斑点状,如仔细观察,可以辨认出它们的运动。孵育2～3天后,可见到阿米巴开始形成包囊,孵育4～5天后可见到滋养体和包囊。狒狒巴拉姆希阿米巴在预铺细菌的平板上不能生长,而在猴肾细胞、人肺成纤维细胞、人脑微血管内皮细胞及无菌复合平板中可以生长[17-18,76-78],但这些技术还不能常规应用。

(五)鉴定和培养

利用传统PCR或real-time PCR技术,可以很好地鉴定自生生活阿米巴。当不能使用PCR方法时,可以根据特征性的运动方式、滋养体和包囊的形态特征及鞭毛试验进行鉴定。单克隆或多克隆抗体的免疫荧光或免疫过氧化物酶试验有助于区分固定组织中的狒狒巴拉姆希阿米巴和棘阿米巴[1,27,30,52,65,79]。从眼部标本中检出的阿米巴可认为是棘阿米巴,因为这是已知唯一导致眼部感染的自生生活阿米巴。

(六)鞭毛试验

1. 将1滴含有阿米巴的脑脊液沉淀物与1 ml无菌蒸馏水混匀置于无菌试管中,或用接种环从阿米巴阳性平板的表面取1环培养物转移到含有1 ml左右蒸馏水的无菌试管中。

2. 轻晃试管,滴1滴悬液于周边已涂有凡士林的盖玻片中央,将载玻片放在盖玻片上,然后再将它们倒过来,用Vaspar密封盖玻片的边缘,将玻片放在湿盒中,如前述孵育2～3 h,同时,按上述方法孵育试管。

3. 用显微镜定期检查试管和玻片,寻找能自由移动的鞭毛体。福氏耐格里阿米巴有鞭毛体期,而棘阿米巴和狒狒巴拉姆希阿米巴没有鞭毛体期,如标本中含有福氏耐格里阿米巴,30%～50%的阿米巴可转变成为梨形的双鞭毛体(图142-3)。

(七)其他培养方法

1. 无菌培养 棘阿米巴很容易在多种不同类型的营养培养基(如蛋白酶-酵母提取物-葡萄糖培养基、胰蛋白酶大豆肉汤培养基和化学组分培养基)中进行培养,不需要添加血清或宿主组织[77]。然而福氏耐格里阿米巴需要在培养基中加入胎牛血清或脑组织浸出物,如Nelson培养基,直至最近化学组分培养基才用于培养福氏耐格里阿米巴[76]。狒狒巴拉姆希阿米巴不能用含有细菌的琼脂平板培养,但可用哺乳动物细胞系或复合无菌培养基[77]。

培养棘阿米巴和福氏耐格里阿米巴可按以下方法进行:从平板表面刮取生长良好的已培养24～36 h的阿米巴,用50 ml阿米巴盐水溶液混悬,经500×g离心5 min。吸去上清,根据所分离的不同阿米巴株,将沉淀接种于蛋白胨酵母浸出液-葡萄糖培养基或Nelson培养基,37℃孵育。在接种阿米巴前,在培养基中加入庆大霉素至其终浓度达50 μg/ml。每周1次将传代培养物接种至含有庆大霉素的培养基,连续3次,可完全杀灭伴随的细菌(如大肠埃希菌和产气肠杆菌)。与此类似,在哺乳动物细胞培养基中生长良好的狒狒巴拉姆希阿米巴可作为原始培养物,在含有生物蛋白胨、酵母提取物、圆酵母RNA、Hanks钙镁盐和维生素混合物的无菌培养基中生长[78]。

2. 细胞培养 棘阿米巴、狒狒巴拉姆希阿米巴和福氏耐格里阿米巴也可接种于含多种哺乳动物细胞的培养物中,如果用于病毒分离的培养基不含抗真菌药(两性霉素B),也可用于培养阿米

巴。阿米巴在这些细胞培养基中生长良好，并产生类似于病毒引起的细胞病变[77-78,80]，由于这种细胞病变的影响，棘阿米巴被误认为是含有病毒的转化细胞类型，并被错误地称为脂病毒(lipovirus)和 Ryan 病毒[1]。

(八)动物接种

接种动物采用 2 周龄、体重为 12～15 g 的 Swiss Webster 小鼠。小鼠用乙醚麻醉，将 1 滴阿米巴悬液滴入小鼠鼻孔，感染福氏耐格里阿米巴的小鼠在出现典型症状后 5～7 天内死亡，典型症状包括皮毛散乱、迷走徘徊、局部瘫痪，最后昏迷死亡。感染棘阿米巴和巴拉姆希阿米巴的小鼠在 5～7 天内死于急性感染或数周后死于慢性感染，所有感染小鼠经培养或组织学检查，均可从小鼠脑组织中查获阿米巴。

(九)血清学试验

这里讨论的血清学技术主要用于研究，而并非常规用于临床实验室。在 GAE、呼吸道窘迫症、视神经炎、黄斑疾病、角膜炎患者血清中可查见抗棘阿米巴抗体[补体结合试验、间接荧光抗体试验(IFA)、沉淀素试验等检测方法][50,61]。

对福氏耐格里阿米巴的抗体反应尚未确定，大多数耐格里阿米巴 PAM 患者在感染后很快死亡，还没来得及产生可测到的抗体水平。但有 1 例存活的 PAM 患者，在住院 10 天后，检测到抗体滴度达 1∶4096[81]。

由于对巴拉姆希阿米巴 GAE 的认识不足，有关血清学反应的资料不多。研究显示，4 例确诊巴拉姆希阿米巴 GAE 患者存在高滴度抗体，6 例不明原因脑炎患者血清学标本(10%的血清样本)抗体滴度达到或超过 64，而对照组血清抗体滴度均未达到 64[29]。根据 Schuster 等[82]的研究，临床表现、实验室结果及影像学疑似阿米巴脑炎的患者可用 IFA 进行棘阿米巴和巴拉姆希阿米巴 GAE 筛查，可早期诊断、早期治疗。最近，Kucerova 等通过 SDS-PAGE 和 Western blot 分析发现，从不同区域、人或动物中分离出来的阿米巴基本一致[83]。

八、治疗

没有一种单一的药物可以有效治疗全身性棘阿米巴病。体外试验中，多数抗菌药物都能有效抗阿米巴，但不能保证这些药物在临床上有效。对于角膜感染而言，不仅要杀死阿米巴虫体，杀灭包囊也非常重要，因为包囊存活可导致疾病复发。体外研究表明葡萄糖酸氯己定、聚六甲基双胍具有良好的杀虫杀包囊作用，并已成功用于棘阿米巴角膜炎的局部治疗，数例棘阿米巴角膜炎患者经过长期的药物联合治疗后痊愈[61]。大多数棘阿米巴 GAE 患者在接受几种药物联合治疗后死亡，仅有少数存活。由棘阿米巴引起的播散性皮肤溃疡而无 CNS 感染患者预后良好。部分棘阿米巴中枢神经系统感染患者通过联合用药(包括阿米卡星、伏立康唑、磺胺类药物和米替福新在内的药物组合)治愈[1,66,84]。

体外试验中，致病性福氏耐格里阿米巴对两性霉素 B 敏感，对 3 种不同福氏耐格里阿米巴临床分离株的最低杀虫浓度为 0.02～0.078 μg/ml[1,9,61,81]。虽然许多 PAM 患者曾接受过两性霉素 B 治疗，但在接受鞘内和静脉注射两性霉素 B 或与其他药物联合使用后，仅有少数患者存活[81,85-86]。

体外研究表明，狒狒巴拉姆希阿米巴对异硫氰酸戊脒敏感，感染患者使用该药物治疗效果好[4,30-31]。尽管大多数巴拉姆希阿米巴 GAE 患者死亡，但少数患者用异硫酸戊脒联合磺胺嘧啶、克拉霉素、氟康唑治疗后存活下来。

对用抗肿瘤和抗寄生虫药米替福新、抗真菌药伏立康唑治疗狒狒巴拉姆希阿米巴、棘阿米巴和福氏耐格里阿米巴进行了体外实验。米替福新、伏立康唑对脑组织和脑脊液的穿透力强，毒性小，是治疗阿米巴脑病的理想药物，这两种药物与其他抗菌药物联合使用，可能是治疗棘阿米巴、巴拉姆希阿米巴和福氏耐格里阿米巴感染的最佳疗法[80]。米替福新与其他药物联合已成功治疗棘阿米巴[66]、巴拉姆希阿米巴[87]和福氏耐格里阿米巴[85-86]。

九、结果的评价、解释及报告

多数临床实验室依靠琼脂平板技术来分离鉴定福氏耐格里阿米巴和棘阿米巴。接种患者脑脊液的琼脂平板需要每天用显微镜观察，若有阿米巴，要刮取有阿米巴的区域，转种到约 1 ml 蒸馏水中，37℃孵育，1 h 内每 10 min 观察 1 次，如果看到鞭毛，应告知临床医生脑脊液耐格里阿米巴

(可能是福氏耐格里阿米巴)阳性。若无鞭毛,2 h后,在高倍镜下(×400)镜检,观察棘突出现的过程,应告知临床医生检出阿米巴,可能为棘阿米巴,湿片镜检的结果需要用永久染色涂片证实(三色染色、苏木素染色、吉姆萨-瑞氏染色),用 real-time PCR 等技术也可以确认阿米巴。很多临床实验室可能没有专家和实验设备,需将标本送到外部实验室如美国疾病预防控制中心进行鉴定和结果解释。美国疾病控制预防中心还能通过网络标本数字图像进行快速评估,以便通过远程诊断服务[称为公共卫生寄生虫病的实验室鉴定(DPDx)]加快审核和咨询。组织切片、脑脊液和组织湿片标本可通过 DPDx 进行快速诊断。当数字图像中无法观察到物种特异性形态特征时,通常需要对脑脊液或组织标本进行分子诊断。此外,临床实验室目前还不能常规进行抗微生物药物检测,只有在疾病预防控制中心偶尔进行研究。临床分离虫株不建议常规进行抗微生物药物检测,对自生生活的阿米巴来说,体外有效的药物不一定在体内有效,例如氟康唑在体外对巴拉姆希阿米巴没有活性,但却是治疗的首选药物之一,一些患者在用氟康唑联合其他药物治疗后痊愈,提示药物之间具有协同作用。

使用商标名称仅供识别,并不意味着公共卫生服务或美国卫生与公众服务部已认可。

参考文献请扫二维码查阅

第143章　肠道和泌尿生殖道阿米巴、鞭毛虫和纤毛虫

SUSAN NOVAK-WEEKLEY，AMY L. LEBER

（梁宏洁　译；苏建荣、曹建平　审校）

溶组织内阿米巴（*Entamoeba histolytica*）和十二指肠贾第鞭毛虫（*Giardia duodenalis*）感染是全球最常见的两种原虫感染，它们的流行和致病性已引起高度关注。阴道毛滴虫（*Trichomonas vaginalis*）也是一种非常常见的性传播感染病原体，影响着全世界数百万人。本章节中所涉及的其他原虫大多为非致病性，非致病性原虫是粪便污染的指标，临床样本中非致病性原虫与其他致病性原虫的检测和鉴别具有临床使用价值，因此需进一步采样以鉴定致病性原虫。致病性和非致病性原虫的区别见表143-1，但也有文献报道患者感染这些非致病性原虫后发病。

粪便标本的显微镜检查仍然是实验室诊断肠道阿米巴、鞭毛虫和纤毛虫感染的主要手段之一。镜检不仅可区分致病性与非致病性原虫，还可准确排除各种可能出现的假象。抗原检测方法如酶免疫试验（enzyme immunoassays，EIAs）、免疫层析试验（immunochromatographic assays）和直接荧光抗体检测（direct fluorescent-antibody，DFA）等方法已经被用来检测溶组织内阿米巴/迪斯帕内阿米巴、溶组织内阿米巴和十二指肠贾第鞭毛虫等病原体。除特殊情况外，培养法一般不适用于临床检测肠道阿米巴，但对阴道毛滴虫的诊断很有价值。核酸检测技术已很成熟，用于检测病原体的文献报道屡见不鲜。一种可以同时检测胃肠道疾病多种病原体（包括多种细菌、病毒和寄生虫）试剂盒[1-3]的成功研发，是寄生虫分子检测相关的重要进展之一。现在还需要很多临床资料，尤其是与肠道寄生虫检测相关的资料来评价这些检测系统的性能及其对结果的潜在影响，但总体来说，分子检测技术比传统检测技术敏感性更高，随着多种多重分子检测方法的广泛应用，如用于溶组织内阿米巴、十二指肠贾第鞭毛虫和隐孢子虫的联合检测等，分子检测技术将可能成为传统检测技术的替代方法。详情参见下面的章节及参考第7、8和138章以获得更多信息。

表143-1　人体肠道和泌尿生殖道阿米巴、鞭毛虫和纤毛虫[a]

寄生虫	致病性	非致病性
阿米巴	溶组织内阿米巴[b]	迪斯帕内阿米巴
		莫氏内阿米巴[c]
		孟加拉内阿米巴[d]
	人芽囊原虫	哈氏内阿米巴
		结肠内阿米巴
		波列基内阿米巴
		牙龈内阿米巴[e]
		微小内蜒阿米巴
		布氏嗜碘阿米巴
鞭毛虫	十二指肠贾第鞭毛虫	迈氏唇鞭毛虫
	阴道毛滴虫	人五毛滴虫
	脆弱双核阿米巴	口腔毛滴虫[e]
		人肠滴虫
		肠内滴虫
纤毛虫	结肠小袋纤毛虫	

注：[a] 除了阴道毛滴虫外，所有的原虫都是肠内寄生。[b] 形态学通常不能区分溶组织内阿米巴、迪斯帕内阿米巴、莫氏内阿米巴和孟加拉内阿米巴；在滋养体细胞质中见到吞噬红细胞提示为溶组织内阿米巴。[c] 莫氏内阿米巴多流行于某些特定地区，可在人粪便标本中检出。该原虫属自生生活阿米巴，形态与溶组织内阿米巴和迪斯帕内阿米巴相同，其致病性尚不完全清楚[10,36]。[d] 孟加拉内阿米巴是最近从有症状和无症状人体粪便标本中鉴定出来的，其形态与溶组织内阿米巴和迪斯帕内阿米巴相同[16]。[e] 牙龈内阿米巴和口腔毛滴虫发现于口腔及其相关标本

一、阿米巴

(一)分类

寄生于人体肠道的阿米巴主要有3个属:内阿米巴属(*Entamoeba*)、内蜒阿米巴属(*Endolimax*)和嗜碘阿米巴属(*Iodamoeba*)。它们均属于变形虫超群(supergroup Amoebozoa)、原阿米巴纲(Archamoebae)、内阿米巴目(Entamoebida),这些病原体借助伪足(一种细胞质的突出物)进行运动(第135章)。脆弱双核阿米巴曾被归类为阿米巴原虫,但现在确认属鞭毛虫,且在形态学上需与阿米巴进行鉴别。

(二)病原体描述

所有11种肠道阿米巴中,包括迪斯帕内阿米巴(*E. Dispar*)、哈氏内阿米巴(*E. hartmanni*)、结肠内阿米巴(*E. coli*)、波列基内阿米巴(*E. polecki*)、牙龈内阿米巴(*E. gingivalis*)、微小内蜒阿米巴(*Endolimax nana*)和布氏嗜碘阿米巴(*Iodamoeba bütschlii*)均为人类非致病性阿米巴。目前,对莫氏内阿米巴(*E. moshkovskii*)和孟加拉内阿米巴(*E. bangladeshi*)的致病性仍知之甚少。溶组织内阿米巴(*E. histolytica*)对人体有致病力,可引起侵袭性肠道和肠道外阿米巴病。

(三)流行病学、传播和预防

阿米巴原虫的生活史均相对简单,包囊为感染形式,摄入被污染的水和食物而感染或直接经粪-口传播。包囊一旦进入消化道即脱囊,逸出滋养体。结肠中环境可能不利于滋养体生长,因而再次形成包囊。包囊随粪便排出,如果不脱水可在水或土壤内存活数天至数周,改善环境卫生状况可有效预防感染。研究者一直致力于溶组织内阿米巴疫苗研制,但至今尚未问世。

(四)标本的采集、运输和储存

为了检出阿米巴,实验室应采集粪便标本进行检查。依据实验室所采用方法和实验环境,新鲜标本和固定保存的标本均可用于阿米巴感染诊断。新鲜标本主要用于检测病原体的运动性,须在留样后尽快检测;湿片法可检测具有活力的虫体,不能用于固定保存标本。值得注意的是,对大多数临床和实验室来说,很难在推荐时间内检查新鲜粪便,最好将标本保存在合适的粪便寄生虫固定液中。其他标本,如抽吸物和组织标本,可根据疑似的病原体进行采集和检测。详细的标本采集说明可参阅第136章。

(五)直接检测

显微镜检查 阿米巴的实验室诊断是通过检查粪便样本中的虫体(滋养体和包囊)进行的。阿米巴重要的形态学特征均可用于鉴别属内虫种,区分体细胞和其他物体。滋养体需与上皮细胞及巨噬细胞进行鉴别,包囊需与多形核细胞区别,还需与粪便中容易混淆的酵母、霉菌、食物残渣和花粉等互相鉴别(表143-2、图143-1和图143-2)。

表143-2 常见肠道阿米巴、人芽囊原虫滋养体和包囊的主要特征[a]

病原体	滋养体	包囊
溶组织内阿米巴/迪斯帕内阿米巴[c]	大小[b]:12~60 μm(通常15~20 μm);侵袭型:>20 μm 运动:进行性、方向性、快速 核[c]:1个,外周染色质均匀分布,核仁小,致密,居中,与结肠内阿米巴类似 胞质:细小颗粒,似"碎玻璃",可含细菌 注:胞质内含红细胞对溶组织内阿米巴具有确诊价值	大小:10~20 μm,球形,居中 胞质:可见拟染色体,两端光滑呈短棒状,也可呈圆形或卵圆形 核:成熟包囊4个;未成熟包囊1或2个。核的特征在永久性染色涂片上更明显
哈氏内阿米巴	大小:5~12 μm 运动:非进行性 核:1个,外周染色质似溶组织内阿米巴/迪斯帕内阿米巴,似固定的环,核仁小,致密,位居中或偏移 胞质:细小颗粒、有细菌、无红细胞 注:与溶组织内阿米巴/迪斯帕内阿米巴区分需准确测量	大小:5~10 μm,球形 核:成熟包囊4个;未成熟包囊1或2个(极常见)。外周染色质细小,均匀分布,不易见,核仁小,致密,居中 胞质:常有拟染色体,同溶组织内阿米巴/迪斯帕内阿米巴

（续　表）

病原体	滋养体	包囊
结肠内阿米巴	大小：15～50 μm（通常 2～25 μm） 运动：迟缓，无方向性 核：1 个，外周染色质粒成堆，不均一，可成固定的环，核仁大，不致密，模糊，位偏 胞质：颗粒状，常见空泡，内含细菌、真菌，无红细胞 注：可像溶组织内阿米巴/迪斯帕内阿米巴，常见合并感染，需要染色涂片	大小：10～35 μm；球形，极少见卵圆形或三角形 核：成熟包囊，8 个，偶可≥16 个；未成熟包囊，≥2 个，外周染色质粗大，分布不均，可似溶组织内阿米巴/迪斯帕内阿米巴，核仁小，位偏但亦可居中 胞质：拟染色体不如溶组织内阿米巴/迪斯帕内阿米巴常见：碎片、粗糙和末端尖锐 注：在永久性染色涂片中可能因渗透性差而失真
微小内蜒阿米巴	大小：6～12 μm 运动：迟缓，无方向性 核：1 个，无外周染色质，核仁较大，“点状” 胞质：颗粒状，有空泡，可能含有细菌 注：核形变异较大，易与哈氏内阿米巴和脆弱双核阿米巴混淆	大小：5～10 μm；卵圆形或圆形 核：成熟包囊 4 个；未成熟包囊 2 个，无外周染色质，核仁比滋养体的小，但比内阿米巴的大 胞质：拟染色体少见，偶见小颗粒
布氏嗜碘阿米巴	大小：8～20 μm 运动：迟缓，无方向性 核：1 个，无外周染色质，核仁较大，“篮状核” 胞质：粗颗粒状，可呈高度空泡状，可见细菌、真菌和碎片 注：需要染色涂片，在核仁外周可见由染色质粒形成的扇形光环	大小：5～20 μm；卵圆形或圆形 核：成熟包囊，1 个；无外周染色质，核仁大，位偏 胞质：无拟染色体，偶见小颗粒 注：有糖原空泡，大，致密，边界清楚，包囊可因大的糖原空泡而塌陷
人芽囊原虫[d]	非常难鉴别，少见	大小：2～200 μm；圆形多见 形态：一般以大的中心体（像大空泡）外面包绕小的多形核，中心体部位可以染出不同的颜色（三色）或保持清晰

注：[a] 引自参考文献[6]。[b] 病原大小以湿片检查结果为依据（在永久染色涂片中，病原体常小于 1～2 μm）。[c] 核及胞质的描述以永久染色涂片检查为依据。[d] 中心体形态描述。[e] 列出了溶组织内阿米巴/迪斯帕内阿米巴的组织学特征，也适用于莫氏内阿米巴和孟加拉内阿米巴

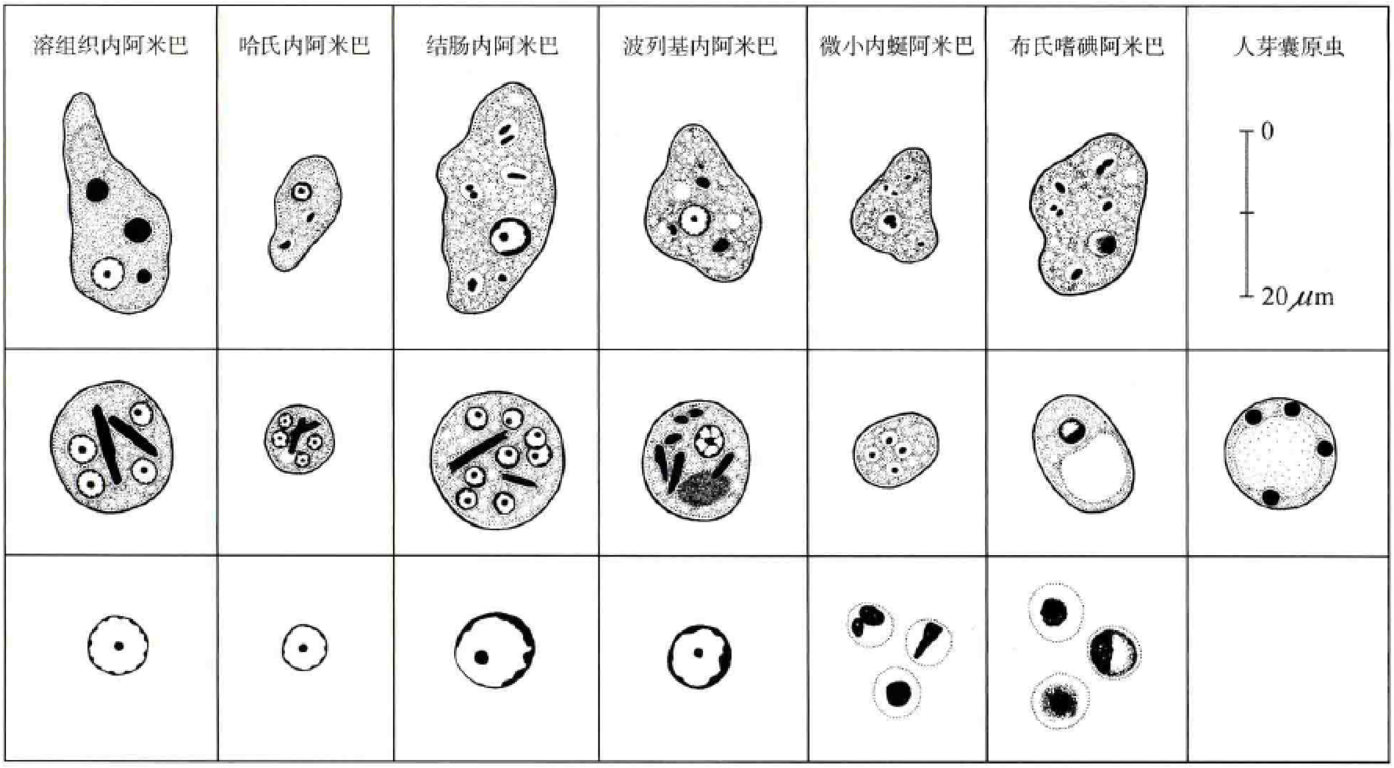


图 143-1　人体肠道阿米巴。上行：滋养体，见溶组织内阿米巴滋养体内有被吞噬的红细胞，此为鉴别致病性溶组织内阿米巴和非致病性迪斯帕内阿米巴、莫氏内阿米巴、孟加拉内阿米巴显微镜下唯一的证据。人芽囊原虫的阿米巴型罕见，难以鉴定；中间行：包囊，对人芽囊原虫描绘了中心体型的特征；下行：滋养体核，按相对比例显示

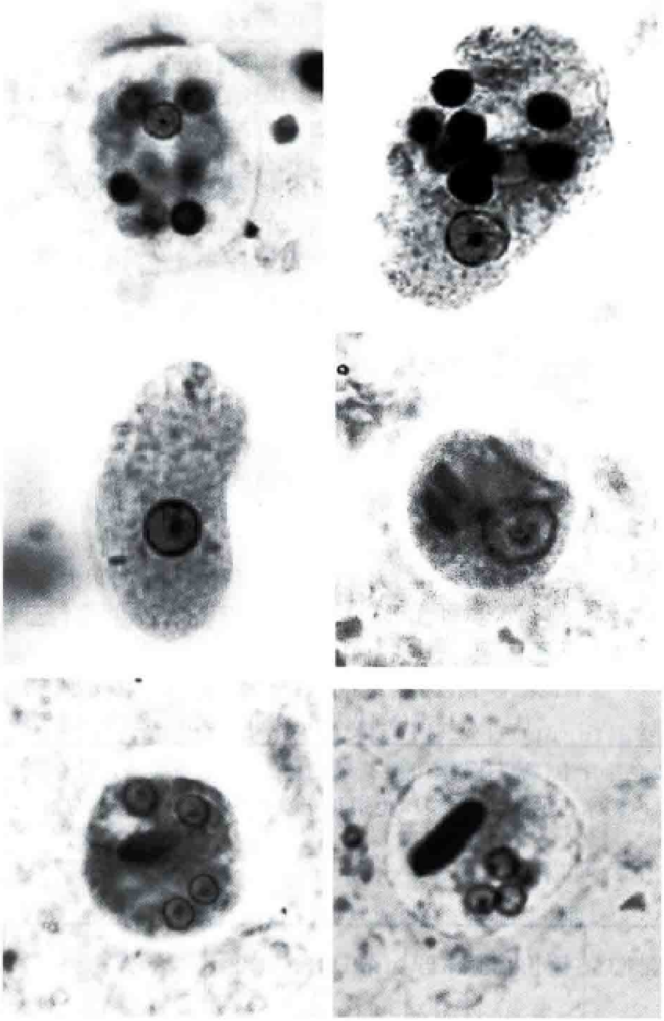


图 143-2 上行：溶组织内阿米巴滋养体，右图为铁-苏木素染色，注意滋养体胞质内有被吞噬的红细胞。中间行：左：溶组织内阿米巴/迪斯帕内阿米巴滋养体，右：溶组织内阿米巴/迪斯帕内阿米巴滋养体包囊前体。下行：组织内阿米巴/迪斯帕内阿米巴包囊。未吞噬红细胞的滋养体、包囊前体和包囊，形态学无法将之鉴定到种。Wheatley 三色染色（L. Garcia 提供），见彩插

粪便样本的形态学检查方法包括新鲜直接涂片（湿片）、浓集物直接涂片（湿片）和永久染色涂片等，用这些方法可识别虫体的特征。染色或未染色的浓集物直接涂片（湿片）对鉴别虫种尤其是对结肠内阿米巴和布氏嗜碘阿米巴包囊的鉴别更有价值。碘液染色湿涂片因染色对比鲜明而有利于原虫与其他生物体鉴别，油镜（放大倍数，×1000）是检查永久染色涂片最常用的方法[4,5]。

只有在新鲜粪便生理盐水直接涂片中才可见到滋养体运动，但通常难以见到。核染色质的排列、大小和形状有助于内阿米巴属内虫种与其他肠道阿米巴的鉴别。核仁的大小和位置也是重要的形态学特征，内阿米巴核仁的特征是核染色质围绕其周形成"公牛眼"，内蜒阿米巴、嗜碘阿米巴和双核阿米巴（flagellate dientamoeba）则缺乏核周染色质。滋养体胞质内可含有颗粒和吞噬物，如红细胞、细菌、酵母和霉菌等。值得注意的是，即使通过永久染色涂片的方法，也很难将微小内蜒阿米巴及布氏嗜碘阿米巴的滋养体鉴别开来[6]。包囊的形态学变化要比滋养体少得多。鉴别诊断应观察胞质内的拟染色体和滤泡，尤应注意布氏嗜碘阿米巴中大的糖原泡。

(六)结果的评价、解释和报告

值得注意的是，检查过程中仅根据一种形态学特征或涂片中单个虫体的特征难以做出判断。核和胞质的形态在同一虫种内会有所变化，但虫种间可能有相似之处，从而使鉴定变得困难。混合感染并不少见，且很容易漏诊，必须对涂片进行完整和综合分析才能做出准确鉴定。运用精确的千分尺测量虫体的各个发育阶段十分重要，虫体大小是区别溶组织内阿米巴/迪斯帕内阿米巴与哈门氏内阿米巴的依据。在永久染色涂片中，由于虫体皱缩，因此所观察到的并非虫体的实际大小。根据形态学检查所观察到不同虫体（滋养体与包囊）的结果，应给予确定的分类学命名。除了芽囊原虫属，在最终报告中无须表明阿米巴的数量（见下文）。

(七)溶组织内阿米巴

1. 病原体描述 无菌培养是鉴定致病性和非致病性溶组织内阿米巴的关键技术，而以前仅依靠单纯的显微镜检查方法进行鉴定。Sargeaunt 和 Williams 应用培养方法[7]对几种糖酵解酶进行了同工酶谱分析，并对电泳条带谱[酶株群（zymodemes）]做了鉴定。结果显示，条带谱可分为 2 个组群：致病性酶株群（侵袭性分离株）和非致病性酶株群（非侵袭性分离株）。2 种酶株群谱表现出稳定的遗传学差异，相互不能转换[8]。此外，致病性和非致病性溶组织内阿米巴在遗传学、生物化学和免疫学方面也存在明显差异。最近，Diamond 和 Clark[9]重新描述了侵袭人体的致病性溶组织内阿米巴（*E. histolytica* Schaudinn，1903）和非致病性迪斯帕内阿米巴（*E. dispar* Brumpt，1925）2 种原虫。

第3种内阿米巴，称为莫氏内阿米巴（*E. moshkovskii*），一般认为是一种在人粪便中偶可查到的自生生活阿米巴。其形态学特点与溶组织内阿米巴/迪斯帕内阿米巴相似。该虫种的流行病学特点尚不清楚，不同人群的流行率不同，人粪便标本中检出率从十分罕见至50%不等[10]，与溶组织内阿米巴/迪斯帕内阿米巴共感染的情况并不少见[11]。另有研究报道表明，该虫与其他不明原因的肠道感染疾病有关[11-14]。近年曾有儿童感染莫氏内阿米巴后引起腹泻的报道[15]。最近，Royer等[16]报道了第4种称为孟加拉内阿米巴（*E. bangladeshi* nov. sp.，Bangladesh）的内阿米巴，形态学上也难以与溶组织内阿米巴/迪斯帕内阿米巴区分。该原虫已从孟加拉国米尔布尔有症状和无症状感染儿童的粪便标本中分离获得。形态学检查溶组织内阿米巴/迪斯帕内阿米巴阳性，但PCR检测时溶组织内阿米巴、迪斯帕内阿米巴和莫氏内阿米巴均为阴性。因此，需要更多的研究去了解莫氏内阿米巴及孟加拉内阿米巴在人类疾病中的作用，以及实验室诊断的重要性[10,13,16]。

2. 流行病学、传播和预防 每年约有5亿人感染溶组织内阿米巴，其中约有5000万结肠炎和肝脓肿病例，10万人死亡[17]。溶组织内阿米巴感染人数与发病率和死亡率之间存在差异，是因为存在两种形态相似但又截然不同的虫种：致病的溶组织内阿米巴，非致病的迪斯帕内阿米巴。迪斯帕内阿米巴的发生率是溶组织内阿米巴的10倍[18]。更精确的流行病学数据需采用新的分子生物学方法来检测和鉴别内阿米巴原虫的种类，可能会改变我们目前对这些感染的流行病学方面的认识[19]。

溶组织内阿米巴在全球范围内均有分布，但更多见于热带和亚热带地区，流行区受感染人口可高达50%。某些卫生状况恶劣的温带地区其感染率可接近热带地区。人类是溶组织内阿米巴的主要宿主，主要因摄入被包囊污染的水或食物而感染，也可通过性传播而感染。

无症状感染未见性别差异性，但侵袭性阿米巴病以男性为主。阿米巴病发病率较高的族群包括来自南美、中美洲和东南亚的移民[6]，在美国，阿米巴病的感染率为4%～5%，其中美国南部居民和收容所人群较其他人群更易感染[6]。有研究发现，溶组织内阿米巴和迪斯帕内阿米巴流行区的短期旅行者较当地居民更易感染致病性溶组织内阿米巴，而当地居民更易携带非致病的迪斯帕内阿米巴[20]。男同性恋者通常通过性行为传播溶组织内阿米巴/迪斯帕内阿米巴，研究显示该人群的感染率可高达30%[21-22]，其中多为无症状感染。美国HIV感染者溶组织内阿米巴发病率较低（13.5例/10 000人·年）[22]，但与美国相比，中国台湾和韩国等非西方国家HIV感染者患侵袭性阿米巴病的风险较高[23-24]，这可能与亚太地区溶组织内阿米巴病较高的地域特性有关[25]。

3. 临床表现 溶组织内阿米巴/迪斯帕内阿米巴感染可能有不同的临床表现：无症状感染、有症状感染但无肠外组织侵袭和有感染症状且有肠外组织侵袭。大部分感染无症状，主要由迪斯帕内阿米巴引起，感染者粪便中有包囊，可见阴性或弱的血清学反应。酶谱型分析证实，大多数无症状个体感染是由非侵入性原虫迪斯帕内阿米巴引起[17,26]。不过，同时感染2种阿米巴的患者也可能没有症状，但粪便中含有包囊[27]。无症状的溶组织内阿米巴感染也可由遗传学特性不同的侵袭性或非侵袭性虫株引起[28]。

阿米巴滋养体入侵肠道组织可导致肠道疾病，约10%的感染者表现为痢疾、结肠炎和罕见的阿米巴脓肿等临床症状。潜伏期可从数天至数月不等。多种毒性因子如黏附素（adhesin）、阿米巴穿孔素（amebapore）和蛋白酶（protease）等与结肠黏膜细胞溶解有关[29]。还有证据表明，细胞凋亡蛋白酶-3（caspase-3）依赖的凋亡是导致宿主细胞破坏的主要机制[30]。分子量为260 kDa的特异性半乳糖/乙酰氨基半乳糖结合凝集素（galactoseor N-acetylgalactosamine-specific lectin）是溶组织内阿米巴的主要侵袭因子。该凝集素介导虫体吸附于肠黏膜上皮细胞，引起接触性细胞溶解[31]。阿米巴痢疾的症状包括痉挛性腹泻、下腹痛、低热和脓血便。由滋养体侵袭引起的肠黏膜溃疡，起初为浅表的局部损伤，之后深入发展形成典型的烧瓶样阿米巴结肠炎溃疡。多个溃疡由正常组织间隔，但能融合。在溃疡边缘处可见阿米巴滋养体，在坏死区一般不易见。肠穿孔和腹膜炎罕见，但为严重并发症，临床多为慢性阿米巴结肠炎，以长期间歇性腹泻为特征，常误诊为溃疡性结肠炎或肠道易激综合征。阿米巴慢性感染导致的阿米巴瘤是一种很少见的阿米巴结肠炎并发症，组织学

显示其为炎性内核包绕有纤维，因其外观呈肿瘤样可被误认为是恶性肿瘤。

病原体通过血液扩散可导致肠外阿米巴病，表现为有或无早期肠道感染症状。肝脏是最常见的肠道外发病部位，其次依次为肺、心包膜、脑和其他器官。症状可呈急性或渐进性，包括低热、右上腹痛和体重减轻。高达5%的伴有肠道感染症状的患者发展为肝脓肿。然而，高达50%的肝脓肿患者无胃肠道疾病史。皮肤阿米巴病累及皮肤和软组织，常与痢疾腹泻和肝脓肿有关，由溶组织内阿米巴滋养体从结肠和直肠直接向肛周或生殖器扩散引起。其他传播机制包括性传播、抓挠直接接种和脓肿破裂后的引流等[32-33]。

4. 直接检查 阿米巴病的实验室诊断需依据粪便、乙状结肠镜获取物、组织活检标本和脓肿吸出物等检查结果判定。血清学检查也可用于肠道外阿米巴病的诊断。实验室诊断方法的选择有赖于可用的资源、资金以及临床的需要等。实验室检查技术及其特点的总结见表143-3。

表143-3 阿米巴病常见实验室诊断方法的特异性和敏感性[a]

检测方法及标本类型	临床表现		
	结肠炎		肝脓肿
	敏感性(%)	特异性(%)	敏感性(%)
显微镜检查			
粪便	>60	10～50	<10
脓液	NA[b]	NA	<25
同工酶分析培养	低于PCR及抗原检测	金标准	<25
抗原检测(ELISA)[c]			
粪便	>95	>95	一般为阴性
血清	65(早期)	>90	～75(后期)；～100(前三天)
脓液	NA	NA	～100(治疗前)
唾液	尚未检测	尚未检测	70
PCR			
粪便	70～>95[d]	>90	很少检测
抗体检测(ELISA)			
血清	>90	>85	70～80(急性期)；>90(康复期)

注：[a] 经允许节选于参考文献[36]。[b] NA. 不适用。[c] ELISA. 酶联免疫吸附试验。[d] PCR. 检测的敏感性取决于PCR仪及PCR扩增方法，实时荧光PCR较常规PCR技术有更高的敏感性

(1)显微镜检查：如前所述，显微镜检查粪便和其他样本的永久染色涂片是标准的形态学检查中最重要的部分，直接涂片法及浓集涂片法也有一定价值(图143-1，表143-2，第138章)。但是仅靠检测滋养体和包囊并不能区分致病性溶组织内阿米巴与非致病性的迪斯帕内阿米巴(图143-1和图143-2)。若能在滋养体胞质内发现被吞噬的红细胞有助于诊断溶组织内阿米巴感染。

然而，在大多数临床标本中发现吞噬红细胞的滋养体的概率并不大[18]，就敏感性而言，Haque等[34]曾发现16%的迪斯帕内阿米巴分离株也可吞噬红细胞，因此，这2个虫种能否吞噬红细胞并非绝对且无特异性[35-36]。在组织标本中仅能发现滋养体，可据此诊断侵袭性溶组织内阿米巴病。

(2)抗原检测：采用非镜检方法可以更明确地区分溶组织内阿米巴和迪斯帕内阿米巴。采用同工酶谱分析方法可达此目的，但需在实验前对标本中的病原体进行培养，对于常规实验室来说不仅昂贵而且操作复杂。目前，美国已有溶组织内阿米巴/迪斯帕阿米巴抗原检测商业化试剂盒，还有一种可同时检测溶组织内阿米巴/迪斯帕内阿米巴、蓝氏贾第鞭毛虫及微小隐孢子虫的免疫层析试剂盒[37]。抗原检测较镜检具有更好的敏感性，根据所选试剂盒，可对溶组织内阿米

巴进行特异性检测[18]。有关抗原检测的商业化试剂盒详情见第 138 章及相关综述[6,18,38]。

新鲜、新鲜冰冻或未固定的人粪便标本可用于抗原检测，使用不同的试剂盒可在粪便中检测出溶组织内阿米巴或迪斯帕内阿米巴。在几种试剂盒中，仅雅培（原 Alere/Tech Lab，Blacksburg，VA，FDA 已认证）提供了一种可特异检测溶组织内阿米巴的 EIA 试剂盒，通过检测半乳糖或 N-乙酰半乳糖胺结合凝集素可检出Ⅱ型溶组织内阿米巴[34,39]。FDA 批准的快速检测试剂盒（溶组织内阿米巴快速检测；TechLab，Inc.，Blacksbulg，VA）可以现场检出特异性溶组织内阿米巴黏附凝集素，特别适合发展中国家使用[40-41]。所有抗原检测方法都比显微镜检简便、敏感和特异（表 143-3）[34,37,42]。基于不同的人群研究，与扩增方法（如 PCR）相比，检测粪便标本中溶组织内阿米巴/迪斯帕内阿米巴抗原，敏感性和特异性均较低[43-44]。由于固定剂可使抗原变性，到目前为止，虽然有检测固定后粪便中抗原的报道，但还没有可用于检测已固定粪便样本（如用福尔马林固定）抗原的试剂盒[45]，对于只能接收固定保存粪便标本的实验室，检测前尚需做大量工作来识别未被固定的其他抗原成分。抗原检测已广泛用于检测其他类型的样本，如血清、脓液和唾液等[46-47]。血清抗原检测是诊断阿米巴肝脓肿和阿米巴肠道感染的一种敏感方法[36,47]。由于仅有不到 10% 的阿米巴肝脓肿并发阿米巴肠道感染患者可通过粪便检测出，因此常规检测虫卵和寄生虫的方法并不适用。显微镜检查或肝脓肿脓液培养的敏感性同样不高。Haque 等[47]用 TechLab 溶组织内阿米巴Ⅱ型试剂盒检测甲硝唑治疗前采集的血清中的抗原，发现其敏感性较高。尽管此方法仍在试验中，但根据血清中抗原在治疗后即消除的现象可监测治疗效果[36,47]。

（3）核酸检测：PCR 等核酸扩增试验已广泛用于溶组织内阿米巴/迪斯帕内阿米巴的检测与鉴别。最常见的靶基因包括核糖体 RNA（rRNA）或种属特异性的重复序列。常规 PCR 已用于检测粪便、肝脏、脑组织或脑脊液标本中滋养体和包囊的 DNA[48-52]，real-time PCR 近期也用于检测溶组织内阿米巴/迪斯帕内阿米巴[43,53]。Haque 等最近报道在血液、唾液和尿样本中采用 real-time PCR 法检测阿米巴肝脓肿和阿米巴结肠炎，结果显示，同时检测尿和唾液可提高检测敏感性，对阿米巴肝脓肿和阿米巴结肠炎的检出率分别为 97% 和 89%，血液中检出率较低，阿米巴肝脓肿和阿米巴结肠炎的检出率分别为 49% 和 36%[54]。其他研究报道表明可应用多重扩增技术对阿米巴虫种进行检测和鉴定，包括溶组织内阿米巴、迪斯帕内阿米巴和莫氏内阿米巴等[18,48,55-56]。应用多种检测技术比单一显微镜检查鉴定更准确，对溶组织内阿米巴感染的治疗更有针对性。由于多种病原体引起的临床表现相似，应同时对粪便中的细菌、病毒和肠道寄生虫等多种病原体进行检测。已有报道应用多重 real-time PCR[57] 可同时检测多种病原体，如溶组织内阿米巴、十二指肠贾第鞭毛虫和隐孢子虫，用串联多重 real-time PCR 检测溶组织内阿米巴、十二指肠贾第鞭毛虫、隐孢子虫和脆弱双核阿米巴等[58]。在此书的写作过程中，有三种多重分子检测技术通过 FDA 和欧盟 CE 认证（表 143-4）。xTAG 腹泻病原体基因检测试剂盒（Luminex Molecular Diagnostics，Austin，TX）通过检测新鲜或 Cary Blair 运送培养基中的粪便样本，可检测出 11 种腹泻病原体，包括十二指肠贾第鞭毛虫、溶组织内阿米巴和隐孢子虫。该方法用磁珠提取核酸，然后进行 PCR 扩增。BioFire FilmArray GI panel 试剂盒（bioMérieux，Salt Lake City，UT）采用巢式 real-time PCR 检测 Cary Blair 培养基中的粪便，可检出十二指肠贾第鞭毛虫、隐孢子虫、溶组织内阿米巴和环孢子虫等 22 种病原体[1]。BD Max 肠道寄生虫检测试剂盒（Becton Dickinson，Sparks，MD）用于检测新鲜或保存于 Cary Blair 培养基中的粪便样本，该方法采用自动提取和多重 real-time PCR 技术检测十二指肠贾第鞭毛虫、隐孢子虫和溶组织内阿米巴[2,59]。初步报告表明这些方法都有效，但寄生虫尤其是溶组织内阿米巴检出率较低（表 143-4）。有人用 FilmArray GI panel 检出了卡耶塔环孢子虫，而这些原虫起初并没有被医护人员发现[60]，显示了该检测方法的优点。随着更多的数据积累和其他 FDA 批准的多重分子检测试剂盒的应用，该方法将在阿米巴病和其他胃肠道寄生虫疾病的实验室诊断中产生显著影响。

表 143-4 商业化检测粪便中原虫的分子扩增试剂盒[a]

产品名称	生产厂商	检出原虫	其他	参考文献
xTAG gastrointestinal panel PCR[b,c]	Luminex; Austin, TX	贾第鞭毛虫,隐孢子虫,溶组织内阿米巴	8 种细菌,3 种病毒	3,134,268
BioFire FilmArray gastroenteritis panel[b,c]	bioMérieux, Salt Lake City, UT	贾第鞭毛虫,隐孢子虫,溶组织内阿米巴,环孢子虫	11 种细菌,5 种病毒	1,268
BD Max enteric parasite panel[b,c]	Becton Dickinson and Co.; Sparks, MD	贾第鞭毛虫,隐孢子虫,溶组织内阿米巴	分离细菌和病毒	2,139,140
Ridagene stool panel PCR[c]	R-Biopharm AG, Darmstadt, Germany	贾第鞭毛虫,隐孢子虫,溶组织内阿米巴,双核阿米巴属		250
Gastrofinder Smart 17 Fast[c]	PathoFinder B. V., The Netherlands	贾第鞭毛虫,隐孢子虫,溶组织内阿米巴,双核阿米巴属	9 种细菌,4 种病毒	269
Gastrointestinal parasite panel[c]	AusDiagnostics, Beaconsfield, Australia	贾第鞭毛虫,隐孢子虫,溶组织内阿米巴,双核阿米巴属,环孢子虫,芽囊原虫		58,269
Allplex gastrointestinal panel 4-parasite[c]	SeeGene, Seoul, Kor	贾第鞭毛虫,隐孢子虫,溶组织内阿米巴,双核阿米巴属,环孢子虫,芽囊原虫	与细菌和病毒的不同组合	269
NaniCHIP GIP[c]	Savyon Diagnostics, Ashdod, IL	贾第鞭毛虫,隐孢子虫,溶组织内阿米巴,双核阿米巴属,环孢子虫,芽囊原虫	其他肠道细菌微阵列分析	270

注:[a] 列表可能未包括所有产品。[b] FDA 批准体外诊断试剂盒。[c] 欧盟 CE 认证体外诊断试剂盒

研究发现,粪便标本的 PCR 检测与显微镜检相比敏感性和特异性更高,至少与抗原检测相比敏感性相当(表 143-3)[36,43,61]。在临床实验室常规检测中,PCR 检测的样品制备程序相对简单,且可以使用已固定标本。研究表明采用不同的提取技术(其中一些比较简单)可从新鲜及已固定标本中提取 DNA[62-64],由于粪便标本存在 PCR 抑制因素[65],因此扩增过程需设立质控[57]。

(4)血清学试验:将血清学试验与抗原检测或 PCR 相结合,对于有症状感染及侵袭性阿米巴病的诊断非常有价值。已普遍应用多种血清学方法,包括间接血凝试验、补体结合实验、乳胶凝集试验及酶免法(EIA)[18,36]在非流行区检测溶组织内阿米巴。经活检确诊的肠阿米巴病患者中 85% 血清抗体阳性,肠外阿米巴病患者血清学试验敏感性接近 99%。对于无症状的肠道感染患者血清学试验无效,除非患者有侵入性感染。人感染迪斯帕内阿米巴无法产生可检测的抗体。侵袭性阿米巴病治愈后,血清抗体可能持续长达 10 年之久,在流行区,这会使诊断更为困难[66]。

EIAs 广泛用于检测 IgM 和 IgG,大多数是基于对抗凝集素抗体的检测,症状出现 1 周后可产生抗体[36]。间接血凝实验实用性强、特异性高,但与 EIAs 相比敏感性较低[36]。有研究表明,使用 IgA 抗体检测有效,IgA 抗体的产生与个体局部免疫反应相关[47,67-68]。目前,已有商业化的阿米巴病血清学诊断试剂盒,部分可在美国使用。血清学试验的相关资料,可参考 Fotedar 等的文章[18],也可参考第 8 章。

5. 治疗 根据 1997 年世界卫生组织会议,不推荐对迪斯帕内阿米巴感染进行治疗。如果在有症状的患者中检测到溶组织内阿米巴/斯帕内阿米巴(不区分虫种),医生必须全面评估临床表现,以决定是否治疗。但是,如果检出溶组织内阿米巴,无论有无症状都必须治疗,在应用抗原检测或 PCR 检测出具体虫种后应进行针对性的药物治疗。

治疗阿米巴病的药物有 2 类:作用于包囊的苯巴比妥类药物(巴龙霉素、双碘喹啉和二氯尼特)和作用于滋养体的组织抗阿米巴药物(甲硝唑、替硝唑和去氢依米丁)[69]。侵袭性阿米巴感染必须先使用组织杀虫剂治疗,然后,再用腔内杀虫剂治疗,组织抗阿米巴药不适合治疗无症状感染(包囊携带者)。迄今为止,未检测到高耐药性的

阿米巴原虫。为了避免治疗失败，治疗后应持续检验粪便。不提倡用药物预防阿米巴病，因为预防用药可能导致耐药从而限制甲硝唑等药物的效用[17,70]。

6. 结果的评价、解释和报告　根据世界卫生组织专家小组关于阿米巴病实验室报告与临床治疗的报道[17]，实验室报告阿米巴感染必须说明所使用方法检测和鉴别致病性和非致病性阿米巴的性能。如果显微镜检测到滋养体和(或)包囊，但无法区分虫种时，报告中应注明"检测到溶组织内阿米巴/迪斯帕内阿米巴"。由于治疗方法不同，实验室报告需注明是否存在滋养体和(或)包囊[6]。

随着对其他内阿米巴虫种认知的不断提高，如果缺乏对致病性和非致病性虫种的鉴别能力，可考虑报告为溶组织内阿米巴/迪斯帕内阿米巴混合群(溶组织内阿米巴、迪斯帕内阿米巴、莫氏内阿米巴和孟加拉内阿米巴)，但必须注意对报告做正确解释(无法区分到种)。实验室可用特异性检测方法，如抗原或 PCR 检测，对粪便内的溶组织内阿米巴/迪斯帕内阿米巴进行进一步检测。这种反向测试有助于做出更具体和适当的治疗方案，符合成本效益要求。

实验室报告应准确反映抗原检测方法能否用于虫种之间的鉴别。PCR 检测在报告溶组织内阿米巴或其他内阿米巴(如迪斯帕内阿米巴)的具体结果时应注明是否检测到核酸。由于扩增法检测的是无活性病原体，因此若用 PCR 检测结果解释治疗失败时应谨慎。与 TechLab *E. histolytica* Ⅱ检测相比，PCR 不能确定检测到的阿米巴的形态。

二、非致病性阿米巴

其他种类的肠道阿米巴除波列基内阿米巴外均无致病性。非致病性阿米巴分布于全球，在气候温暖地区更为流行，需使用永久性染色涂片检查将它们与致病性的溶组织内阿米巴进行鉴别(表 143-2，图 143-1)。

哈氏内阿米巴的形态与溶组织内阿米巴/迪斯帕内阿米巴相似(图 143-3)。虫体的大小是最关键的鉴别特征。新鲜粪便直接涂片中的结肠内阿米巴滋养体难以与溶组织内阿米巴/迪斯帕内阿米巴滋养体相区分。成熟的结肠内阿米巴包囊难以固定，在永久性染色涂片中少见，可在直接涂片中检出(图 143-4)，是人粪便样本中最常见的阿米巴。波列基内阿米巴(*E. polecki*)与猪关系密切，是巴布亚新几内亚等地区最常见的人体肠道寄生虫，其滋养体与溶组织内阿米巴/迪斯帕内阿米巴和结肠内阿米巴相似，包囊一般含 1 个核。牙龈内阿米巴是首个被报道的人体寄生性阿米巴，存在于齿间牙垢和痰中，其滋养体胞质内常含有吞噬的白细胞，未发现有包囊。

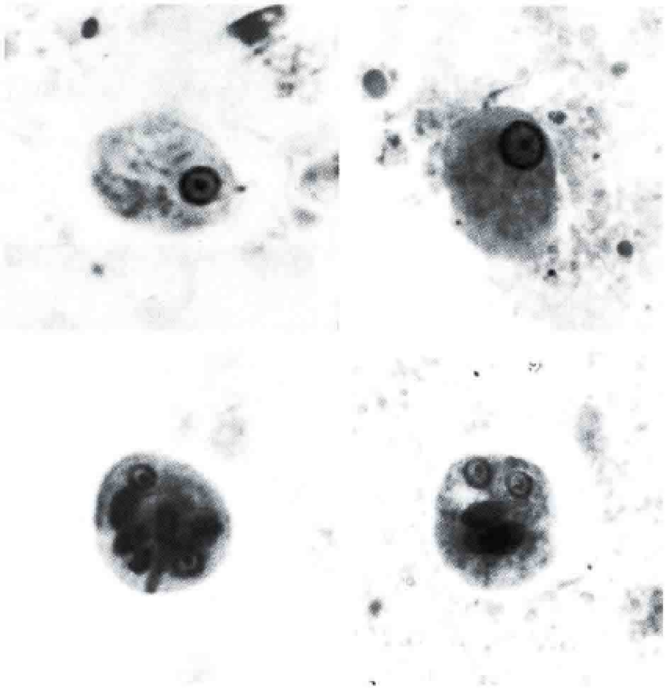


图 143-3　上行：哈氏内阿米巴滋养体(注意"牛眼"核，清晰致密的核仁)；下行：哈氏内阿米巴包囊(注意它们通常有两个细胞核，并含有多个拟染色体)。Wheatley 三色染色(由 L. Garcia 提供)，见彩插

与哈氏内阿米巴一样，微小内蜒阿米巴是一种较小的肠道内阿米巴，它与结肠内阿米巴一样普遍见于大多数人群中。细胞核形态变异很大，与脆弱双核阿米巴和哈氏内阿米巴相似(图 143-5)。微小内蜒阿米巴包囊一般呈卵圆形，滋养体和包囊常见于粪便。布氏嗜碘阿米巴与其他非致病性阿米巴具有相同的分布，但较结肠内阿米巴和微小内蜒阿米巴少见，其滋养体与微小内蜒阿米巴的滋养体相似，两者之间很难区别，其包囊很有特色，呈圆形或卵圆形，内含 1 个大的糖原泡(图 143-5)。

对于任何非致病性阿米巴感染均无须进行治疗，但应向卫生部门报告，因为这表明宿主接触了被污染的食物或水，可能存在致病性寄生虫，需要

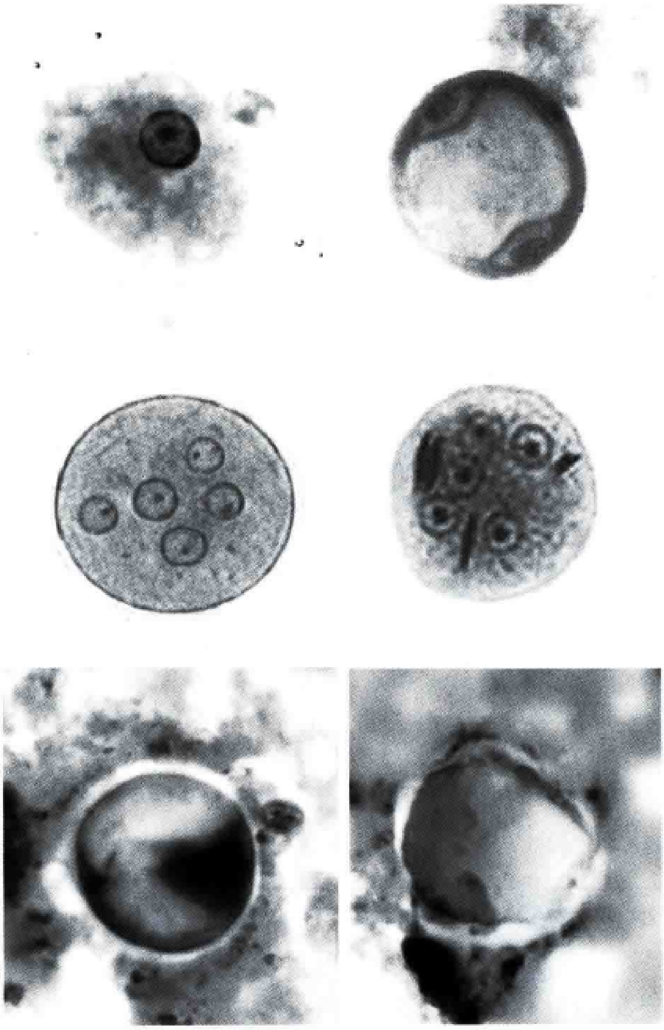


图 143-4 上行:左:结肠内阿米巴滋养体(注意不均匀的核小体和巨大的斑点状的核染色质);右:结肠内阿米巴包囊前体(注意两个增大的细胞核,包囊两边各一个)。中间行:左:结肠内阿米巴包囊,湿片碘染色(注意 8 个核之中的 5 个很清晰,碘染色的典型颜色);右:结肠内阿米巴包囊(注意这种形态非常好,但并不常见)。下行:结肠内阿米巴包囊。大多数固定剂对包囊作用欠佳,包囊固定后经常出现皱缩和变形,并显示从红到紫到蓝的各种颜色。因此,这些包囊常见于浓缩的湿片上,但在永久染色的涂片上看不清楚。如无特殊说明,上图均采用 Wheatley 三色染色(由 L. Garcia 提供),见彩插

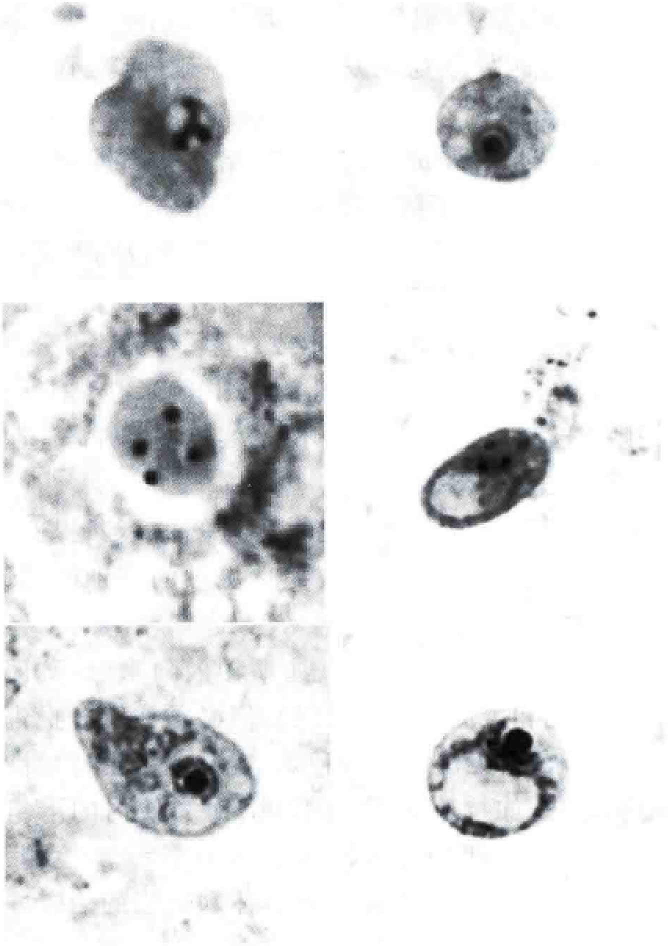


图 143-5 上行:左:微小内蜒阿米巴滋养体(注意核小体的变化,这是微小内蜒阿米巴的典型特征);右:微小内蜒阿米巴滋养体(注意较多正常核小体,偶尔也会出现一些外周核染色质)。中间行:左:微小内蜒阿米巴包囊(可见 4 个典型的核小体);右:微小内蜒阿米巴包囊(注意 4 个核小体和液泡,有单个液泡的包囊并不少见)。下行:左:布氏嗜碘阿米巴滋养体;右:布氏嗜碘阿米巴包囊(注意单个的核小体和大的糖原泡)。Wheatley 三色染色(由 L. Garcia 提供),见彩插

进行进一步研究。可通过改善个人和环境卫生来预防非致病性阿米巴感染。

三、芽囊原虫属(*Blastocystis* species)

1. 分类 芽囊原虫属(原称人芽囊原虫,*Blastocystis hominis*)的分类早在 1912 年就被首次提出,但经过多次改变,至今仍不明确[71-72]。芽囊原虫属属于 SAR 超群[不等鞭毛类(Stramenopiles)超群、芽囊原虫属(*Blastocystis*)](第 135 章)。分子研究表明,芽囊原虫与蜥蜴前鞭毛虫(*lacertae Proteromonas*)密切相关[73-75]。有趣的是蜥蜴前鞭毛虫是一种鞭毛动物,但芽囊原虫没有鞭毛,不能运动。遗传、生化和免疫学分析表明属内存在种间生物多样性[76-78]。研究表明寄生于人类和动物的芽囊原虫可分为 12 种或更多[78]。

2. 病原体描述 芽囊原虫生命周期包括包囊型、中心体型(也称为空泡型)、阿米巴型和颗粒型。除了颗粒型都能在人的粪便标本中观察到,中心体型最常见。人体摄入包囊型而感染,在大肠中裂囊释放出中心体型。中心体型可产

生颗粒型或阿米巴型，反之亦然[6]。芽囊原虫的自然生活史和感染方式尚不明确，有待研究和实验予以证实。芽囊原虫的伪足可以伸展和收缩，其以二分裂或产孢方式进行繁殖，严格厌氧并能吞食细菌及其他碎片。可观察到薄壁和厚壁包囊，厚壁包囊可通过粪-口途径传播，薄壁包囊引起内源性感染[79]。包囊型为生命周期中最近被描述的形式，包囊多数为卵圆形或球形，在新鲜粪便和培养状态下形态变化很大[75]。中心体型在粪便样本中最常见，膜状中心体型可占据细胞体积的 90%以上，并且可能在增殖中发挥作用。阿米巴型很难在人类标本中观察到，腹泻的粪便样本中偶见[6]，在培养物内可观察到颗粒型。

3. 流行病学、传播和预防 芽囊原虫是人和动物常见肠道寄生虫，在全球广泛分布[75]，约有 10 亿人被感染，多数无症状[80]。不同地域粪便样本的检出率为 1%～40%。通过人-人、动物-人和水源传播等方式传播[75,78,81-82]。

4. 临床表现 芽囊原虫对人体的致病性仍存在争议，反对和支持其有致病性的研究均有报道[83-85]。由于该虫有多种基因型，人体中发现了其 17 个基因亚型中的 9 个，有确凿的证据表明其可分为致病性和非致病性[75,86]。最近，人类肠道微生物组的宏基因组分析已被用于研究患病率、遗传多样性和与疾病状态的关系[87-88]。这些分析不依赖于原虫的生长，能够更全面地评估受感染个体的真实数量，并显示出该属内令人难以置信的遗传多样性水平。尽管还需要更多的此类研究，但使用大规模的比较宏基因组学分析的初步数据显示，过敏性肠道疾病、肠易激综合征和肥胖等疾病与之可能无相关性[88-89]。尽管科学争论仍在继续，临床医生可能还是会对芽囊原虫感染者进行治疗，尤其是当芽囊原虫大量存在而无其他病原体感染的情况下。此时最常见的症状包括无发热的反复腹泻、呕吐和腹痛等，HIV 感染、肿瘤和肠道功能异常等可能会让这些症状更加明显和持久[90-91]。其他研究表明，有症状的芽囊原虫感染患者接受治疗后症状好转，其原因可能与清除了另一种未检测到的病原体有关[83]。Albrecht 等[92]研究发现，即使 HIV 患者存在严重的免疫缺陷，芽囊原虫也没有致病性，检出并不意味着需要治疗。

5. 直接检测

(1)显微镜检查：在常规粪便检查中，若查到典型的中心体型即可做出诊断(表 143-2，图 143-1 和图 143-6)。虽然这是最常用的方法，但它比 PCR 等其他方法敏感性差[93]。中心体型的大小差异很大，一般为 2～200 μm。不同分离株之间及其内部的大小也存在巨大差异。空泡型内含有 1 个大的中心空泡，占据了细胞的 90%[75,94]。永久染色涂片检查是首选方法。如果在固定前将虫体暴露在水中(对虫体进行浓集)可能导致滋养体和中心体型裂解，并因此产生假阴性结果。实验报告应标明检查到的虫体数目(少、中或多)。由于三色染色法更敏感，因此，不提倡采用碘染色进行湿片观察[75]。

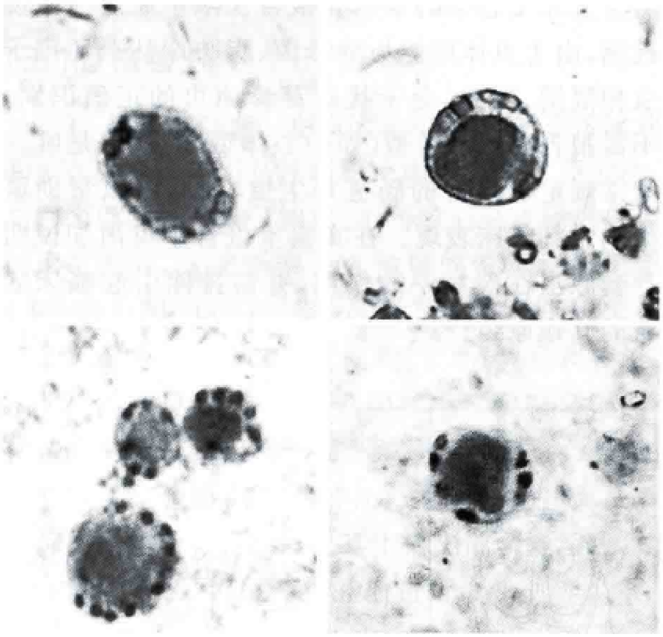


图 143-6 上行：芽囊原虫中心体型(碘染色，注意中央部位及外周核)。下行：芽囊原虫中心体型，Wheatley 三色染色(由 L. Garcia 提供)，见彩插

(2)其他诊断方法：已有报道表明，可以进行粪便中虫体的培养，而且较显微镜检更敏感，但并非常规方法[81]。应用 EIA 和荧光抗体等试验方法可检测出芽囊原虫的血清学反应[75,95-96]。此种抗体反应仅证明人芽囊原虫是人类的病原体，但并无诊断意义，仅可用于流行病学和血清学研究。无症状个体可能在感染两年后才能检测到血清学反应[97]。Tan[75]在其综述中详细描述了芽囊原虫的诊断和鉴定的分子生物学方法。分子生物学检测可能更敏感，但仍未在临床实验室中常规使用[89]。Stensvold 等指出，由于无症状感染时的共性及长期携带，目前，不论是芽囊原虫的分子生物学检测，还是多重分子检测试剂

盒，作为芽囊原虫和溶组织内阿米巴的常规检测可能都没有意义[89]。

6. 治疗 只有明确证实芽囊原虫是肠道致病病原体时，才能根据患者的全部临床症状确定治疗。现行治疗建议包括使用甲硝唑、复方磺胺甲基异噁唑，同时硝唑尼特、替硝唑、巴龙霉素、碘喹啉和酮康唑等也有使用[98]。目前，甲硝唑为首选药物。虽然芽囊原虫的体外药物敏感性实验数据有限[85]，但对甲硝唑耐药已有报道[99-100]。有报道表明给予甲硝唑和复方磺胺甲基异噁唑治疗并不能清除患者粪便中的虫体。

7. 结果的评价、解释和报告 大多数实验室对芽囊原虫感染的检测和报告仅限于通过显微镜检测，由于虫体可能与酵母菌、脂肪球甚至环孢子虫相混淆，因此，会干扰对芽囊原虫的正确识别。不需报告虫体的类型（如中心体型）。该虫是唯一需常规定量报告的肠道寄生虫，如此可以帮助医生确定其临床表现。在实验室报告中可附加说明芽囊原虫在疾病中的作用，并需排除引起临床症状的其他原因。

四、鞭毛虫

（一）分类

关于真核生物鞭毛的正确命名存在争议，科学界有些人建议将它们称为纤毛，但这在临床微生物学领域尚未得到广泛采用，为了便于探讨，本书将继续称之为鞭毛。

有几种鞭毛虫对人类有致病性，而其他鞭毛虫对肠道无致病性。鞭毛虫分类如下：十二指肠贾第鞭毛虫（*G. duodenalis*）属于古虫界，后滴门，多鞭毛虫纲（Fornicata），双滴目，贾第鞭毛虫属；人肠滴虫（*Enteromonas hominis*）属于古虫界，后滴门，多鞭毛虫纲（Fornicata），双滴目，Hexamitinae；迈氏唇鞭毛虫（*Chilomastix mesnili*）和肠内滴虫（*Retortamonas intestinalis*）属于古虫界，后滴门，多鞭毛虫纲（Fornicata），曲滴目；阴道毛滴虫（*T. vaginalis*）属于古虫界，后滴门，副基体纲（Parabasalia），毛滴目（图 143-7；第 135 章）。

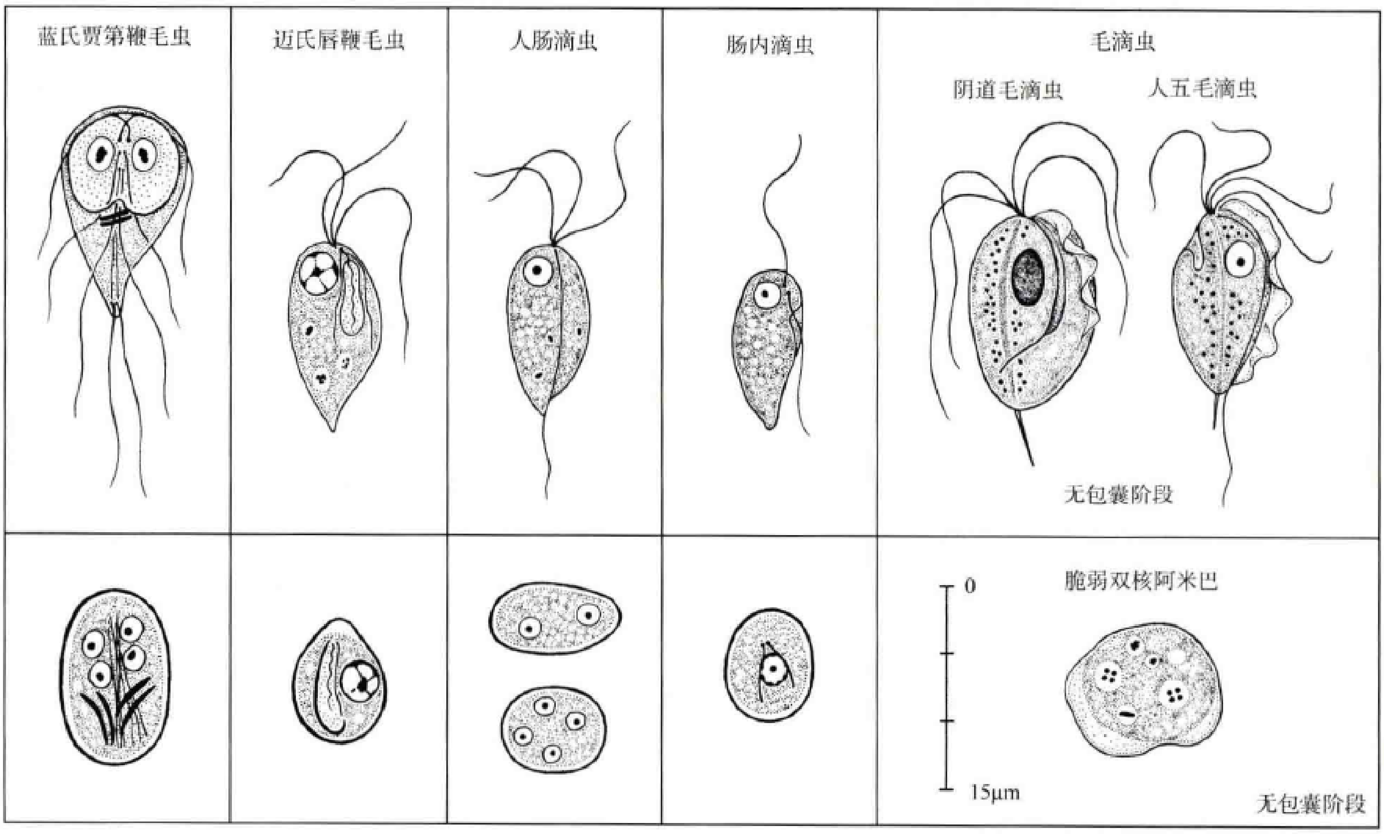


图 143-7 人肠道和泌尿生殖道鞭毛虫。上行：滋养体。阴道毛滴虫见于泌尿生殖道；所有其他鞭毛虫均见于肠道。下行：包囊。脆弱双核阿米巴滋养体如图显示，包囊期未显示

(二)病原体描述

有些寄居于肠道的鞭毛虫为共生体,且对人体无害。致病性鞭毛虫包括十二指肠贾第鞭毛虫(*G. duodenalis*)、脆弱双核阿米巴(*D. fragilis*)和阴道毛滴虫(*T. vaginali*)。非致病性鞭毛虫包括迈氏唇鞭毛虫(*C. mesnili*)、人肠滴虫(*E .hominis*)、肠内滴虫(*R. intestinalis*)和人五毛滴虫[*Pentatrichomonas*(*Trichomonas*)*hominis*]。如上所述,脆弱双核阿米巴(*D. fragilis*)已被列为一种鞭毛虫,并且和毛滴虫密切相关。

(三)流行病学、传播和预防

除阴道毛滴虫外,鞭毛虫的传播多通过摄入被污染的食物或水。除了毛滴虫外,6 个属的鞭毛虫均以包囊形式传播,包囊在脆弱双核阿米巴感染传播中的作用尚不清楚。迄今为止,只观察到毛滴虫的滋养体形式,包囊一旦进入肠道内,虫体即脱囊,释放滋养体并附着于肠上皮细胞。在人体内最终通过粪便将具有活力的包囊释放到环境中而完成其生活史。事实表明,任何一种鞭毛虫不论是否具致病性,只要与粪便接触均可感染。所以,防止与粪便接触是预防感染的关键,改善卫生条件是预防感染的必要措施。目前,尚无用于预防人鞭毛虫的疫苗。

(四)标本的采集、运输和储存

鞭毛虫和纤毛虫的实验室检测主要通过粪便标本的显微镜检查。也可用吞线试验(肠内试验;Nutri-Link Ltd.,英国)检测贾第鞭毛虫,具体方法详见下述。新鲜或保存的标本均可用于检测,但后者是大多数常规临床实验室的首选。如果所送为新鲜标本,则须根据大便的黏稠性在特定时间段内观察虫体的运动。用于免疫学试验或 DFA 试验的粪便样本可用福尔马林固定。如果十二指肠贾第鞭毛虫免疫学试验显示阴性,固定后的样本也可以用于虫卵和寄生虫的检查。标本采集和运输的详细信息见第 136 章。

(五)直接检查

1. 显微镜检查 在临床实验室,粪便直接涂片和永久染色涂片仍是诊断鞭毛虫感染的主要方法。与阿米巴(如上所述)相比,不同鞭毛虫之间有较大的形态差异,这使得鞭毛虫种属的鉴定相对简便(表 143-5,图 143-7)。为有助于滋养体的鉴别,需注意的关键特征包括鞭毛的形状、大小、数目和位置、细胞核的数目、是否存在螺旋沟槽和胞口,以及其他特有的特征如吸盘或波膜。通常,核的大小、形状和数目是包囊的鉴别特征。由于湿涂片无法反映标本中的所有病原体及其生活史的不同阶段,始终建议使用永久染色涂片检查进行诊断。

表 143-5 常见肠道和泌尿生殖道鞭毛虫滋养体和包囊形态特征[a]

病原体	滋养体	包囊
脆弱双核阿米巴	大小[b]:5～15 μm;形态似阿米巴 运动:非进行性;有角的伪足 鞭毛:内化(仅电镜可见) 核[c]:1 个(40%)或 2 个(60%);无外周核染色质;4～8 粒核仁簇 注:滋养体未染色情况下不清晰;滋养体大小有差异,胞质呈颗粒状,可见空泡	大小[d]:5～8 μm;卵圆或圆形;其内虫体约 5 μm;包囊有内外壁,人类样本中罕见 核:1 或 2 注[d]:包囊有明显的壁,其不规则的内壁与包被的寄生虫直接相邻;外壁与包囊寄生虫之间存在围食膜的空间
十二指肠贾第鞭毛虫	大小:长 10～20 μm,宽 5～15 μm;梨形 运动:落叶式 鞭毛:外侧 4 根,腹部 2 根,尾部 2 根 核:2 个;湿片上不易见,中心见小的核仁 注:滋养体腹面的吸盘显著,侧面观呈勺形,可见 2 根鞭毛轴丝	大小:长 8～19 μm,宽 7～10 μm,卵形,椭圆形,或圆形 核:4 个核通常位于一端;未染色片上不清晰,无外周染色质,核仁比滋养体期更小 胞质:染色能使其收缩,表现为胞质从胞壁中脱离;可以看到 4 个副基体 注:可见轴丝

（续 表）

病原体	滋养体	包囊
迈氏唇鞭毛虫	大小：长 6～24 μm，宽 4～8 μm；梨形 运动：僵硬，旋转 鞭毛：前面 3 根，胞口 1 根 核：1 个；染色不明显 细胞质：显著的胞口延伸至虫体 1/3～1/2 处；呼吸沟穿过腹面，隐约可见，可见空泡	大小：长 6～10 μm，宽 4～6 μm；柠檬形，前端有透明结 核：同滋养体，未染色片中难见，核仁位中，不清晰 细胞质：沿着胞口的弯曲纤丝被称为“牧羊人之杖”
人五毛滴虫	大小：长 5～15 μm，宽 7～10 μm；梨形 运动：跳跃，快速 鞭毛：前面 3～5 根，后面 1 根（延出体外） 核：1 个；未染色片中不可见 细胞质：中间纵向的轴柱，波动膜延伸至虫体全长 注：可能有很大的核形变异，可与哈氏内阿米巴和脆弱双核阿米巴相似	无包囊期
阴道毛滴虫	大小：长 7～23 μm，宽 5～15 μm 运动：跳跃，快速 鞭毛：前面 3～5 根，后面 1 根 核：1 个；未染色片中不可见 注：波动膜延伸至虫体一半，无自由后鞭毛	无包囊期
人肠滴虫	大小：长 4～10 μm，宽 5～6 μm；卵形 运动：跳跃 鞭毛：前面 3 根，后面 1 根 核：1～4 个；未染色片中不可见 注：虫体一侧平，后鞭毛向后侧或两侧自由延伸	大小：长 4～10 μm，宽 4～6 μm，细长或椭圆 核：1 个；未染色片中不可见 注：似微小内蜒阿米巴包囊，纤维或鞭毛一般不可见
肠内滴虫	大小：长 4～9 μm，宽 3～4 μm；梨形或卵圆形 运动：跳跃 鞭毛：前面 1 根，后面 1 根 核：1 个；未染色片中不可见 注：难鉴定；罕见；突出的胞口延伸至身体长度的 1/2	大小：长 4～9 μm，宽 5 μm；梨或柠檬形 核：1 个；未染色片不可见 注：类似于唇鞭毛虫包囊；纤丝呈鸟嘴状排列；纤丝从核上延伸形成胞口处的阴影

注：[a] 改编自参考文献[6]。[b] 虫体大小依据湿片所得（永久涂片一般要小 1～2 μm）。[c] 核和胞质的描述依据永久染色涂片。[d] 虽然包囊的形式在文献中已有所描述，但仍需进行独立验证

2. 其他诊断方法 近年来，抗原检测相比显微镜检查更易操作而广泛普及，如十二指肠贾第鞭毛虫的检测。此外，核酸扩增法可用于检测临床标本中阴道毛滴虫及水和临床标本中的十二指肠贾第鞭毛虫，但不能作为临床实验室常规检测。鞭毛虫的抗原检测及核酸扩增检测将在后面详述。应用血清学试验可对十二指肠贾第鞭毛虫感染进行诊断，但尚未常规应用于临床。

3. 结果的评价、解释和报告 无论是直接涂片或是永久染色涂片，玻片代表性区域的观察对诊断至关重要，同时必须用千分尺准确测量鞭毛虫生活史各期的大小。显微镜检查结果报告应明确注明检测到的寄生虫种类及发育阶段（滋养体与包囊）[4]。不宜用定量法来检测鞭毛虫的数目。

（六）十二指肠贾第鞭毛虫

1. 分类 十二指肠贾第鞭毛虫（*G. duodenalis*）属于古虫界、后滴门、多鞭毛虫纲、双滴虫目、贾第鞭毛虫属（第 135 章）。

2. 病原体描述 十二指肠贾第鞭毛虫是一种感染人和动物的肠道鞭毛虫，为全球最常见的肠道寄生虫病原体。此虫在分类和命名方面仍然存在争议，文献将这种病原体称作蓝氏贾第鞭毛虫（*Giardia lamblia*）、肠贾第鞭毛虫（*Giardia intestinlalis*）或十二指肠贾第鞭毛虫（*G. duodenalis*）。已有大量综述文献对贾第鞭毛虫分类学进行了深入探讨[101]。目前，一般将十二指肠贾第鞭毛虫作为人感染贾第鞭毛虫的公认种名。据

Feng 和 Xiao 所述，贾第鞭毛虫共有 6 个种：阿氏贾第鞭毛虫（*G. agilis*）、花鹭贾第鞭毛虫（*G. ardeae*）、鼠贾第鞭毛虫（*G. muris*）、微小贾第鞭毛虫（*G. microti*）、鹦鹉贾第鞭毛虫（*G. psittaci*）和十二指肠贾第鞭毛虫（*G. Duodenalis*）[101]。

现已公认十二指肠贾第鞭毛虫具有丰富的遗传多样性。基于分子生物学方法，将贾第鞭毛虫属又分为几种主要的基因型和基因亚型。人感染的主要基因型为集聚体 A 型和 B 型。集聚体 A 型是来自人和动物分离株的混合体，而集聚体 B 型仅为来自人的分离株。多数由动物传染给人的贾第鞭毛虫与集聚体 A 型相关[102]。

3. 流行病学、传播和预防　十二指肠贾第鞭毛虫感染是通过粪-口途径或摄入被包囊污染的食物或水而传播的。仅 10～100 个包囊便足以感染人体[103]。在发达国家感染常见于日间托儿所的孩子，旅行者和免疫功能低下者。在免疫功能低下者中，艾滋病、低丙种球蛋白血症和营养不良者易感。此病原体的患病率在工业化国家为 1%～7%，发展中国家为 5%～50%。在美国，十二指肠贾第鞭毛虫是最常分离得到的肠道鞭毛虫。高风险的室内环境，如日间托儿所，患病率可高达到 90%[104]。现在已经有应用于猫和狗的贾第鞭毛虫疫苗，这可能会对人类感染的流行程度有所影响[105]。

摄入具有活力的包囊即可感染，包囊脱囊后转化成滋养体。脱囊而出的滋养体即表现出对十二指肠的趋向性，并借助位于腹部的吸盘附着于肠黏膜上皮细胞。在感染过程中虫体始终保持对上皮的吸附而不入侵黏膜。在肠道内，滋养体以二分裂方式产生相同的两个子代滋养体。滋养体下移至大肠，形成感染性包囊，进而排出体外[6]。

4. 临床表现　大多数十二指肠贾第鞭毛虫感染者无症状。无症状感染和有症状感染可能是由 2 种具有不同毒力贾第鞭毛虫虫株导致的结果。初步研究将十二指肠贾第鞭毛虫分成 A、B 2 个组群，A 组群似乎表现出更强的致病力，与有症状感染有关。同工酶谱分析和分子生物学研究表明，A 组群和 B 组群互不相同，类似于溶组织内阿米巴和迪斯帕内阿米巴之间的情况。A 组群和 B 组群的基因同源性可达 81%～89%[106-108]。在有症状的感染者中，急性十二指肠贾第鞭毛虫感染可与原虫、病毒和细菌等其他病原体感染混淆。经过 12～20 天的潜伏期后，患者可出现恶心、畏寒、低热、腹痛和突然发作的水样腹泻。腹泻通常呈暴发性，表现为恶臭，不含血、细胞渗出物或黏液。部分病例可为有症状的亚急性或慢性感染，如反复腹泻、腹部不适、腹胀、嗳气和烧心等。慢性患者腹泻可导致脱水、吸收不良和胰腺功能受损等[109]。患病率因地域而异[110]。

研究表明，在非流行环境中感染贾第鞭毛虫，可在数年后发生慢性疲劳和肠易激综合征。虽然贾第鞭毛虫的发病率会随着时间推移而降低，仍有一些患者出现长期并发症[111]。在贾第鞭毛虫流行的国家进行的大型多中心研究发现其与腹泻无关[112-114]，在贾第鞭毛虫研究领域由于这一证据的增多出现了一些混乱。在这些地方没有出现腹泻的合理解释是，人体在 2 岁前就已经建立了免疫应答。贾第鞭毛虫在许多国家被认为是一种共寄生物，寄生于较大的儿童和成人中[115]。

5. 直接检测

（1）显微镜检查：尽管许多实验室已开始用抗原检测方法，但十二指肠贾第鞭毛虫感染的诊断通常以粪便标本显微镜检查发现包囊和（或）滋养体而确认。虽然用直接涂片可以查到滋养体，但染色涂片更有助于辨别滋养体的发育阶段（表 143-5，图 143-7 和图 143-8）。由于粪便标本中的包囊常可被黏液包裹，同时包囊的排出模式具有周期性，使之难以在涂片中检出而导致漏诊。在此种情况下，使用吞线试验（Entero-Test，肠内试验）有助于获得合格的临床样本。吞线试验操作程序：先让患者吞咽一粒内含明胶和紧密缠绕的丝线的重力胶囊。5 h 后将丝线从患者口腔拉出，取线上的附着物制成湿片或永久性涂片镜检[6]。此外，也可用内镜收集临床标本，但因该法为有创检查，故仅用于临床表现复杂病例的诊断[104]。

（2）抗原检测：广泛应用于检测粪便标本中十二指肠贾第鞭毛虫的其他免疫学方法包括 EIA、DFA 试验和免疫层析法[6, 116]。这些方法具有非常高的特异性（90%～100%）和敏感性（63%～100%）[117-122]。虽然已证明这些方法比常规粪便涂片染色法（三色染色法）更具敏感性和特异性，但如果不进行直接涂片和永久染色涂片检查，可能会漏检其他重要的病原体。Merifluor 免疫荧光检测试剂盒（Meridian Bioscience，Inc.，Cincinnati，OH）已广泛应用，但需配备荧光显微镜。

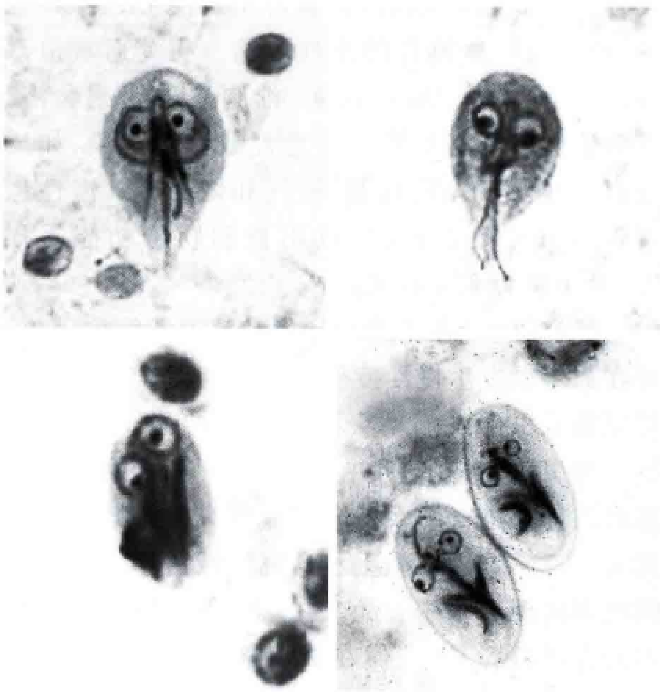


图 143-8 上行：十二指肠贾第鞭毛虫（蓝氏贾第鞭毛虫，肠贾第鞭毛虫）滋养体。注意其呈泪珠状、双核、直线形轴丝和弯曲的副基体。下行：十二指肠贾第鞭毛虫（蓝氏贾第鞭毛虫，肠贾第鞭毛虫）包囊。注意，虽然有多个核，但它们都不在这些图像的焦点框架内。除了右侧的包囊为苏木素铁染色，所有寄生虫均为 Wheatley 三色染色（由 L. Garcia 提供），见彩插

DFA 检测的敏感性和特异性＞95％。免疫测定法可用于检测大量患者标本。各种研究表明 EIA 的表现优于虫卵和寄生虫检查[118,123-124]。市场上已有几种商业化免疫测定试剂[6,121,125-126]。

值得注意的是，如果患者为免疫功能低下者，且有旅游史，或疑有与特殊病原体接触史，均需进行常规寄生虫学检查。研究表明，免疫学检测方法的应用，并不仅需一份粪便标本。如果只做一份粪便标本的免疫检测，无症状患者的阳性标本可能会漏诊[127]。需注意，某些免疫学检测方法会受到标本被血液污染的影响。已有研究表明，血液可干扰 ProSpecT 试验的性能并可造成假阳性结果[119]。免疫层析检测方法已用于临床实验室[37,123,127-129]。ImmunoCard STAT（Meridian Bioscience，Inc.）建立了快速固相定性免疫层析法，可以检测粪便标本中的十二指肠贾第鞭毛虫和微小隐孢子虫抗原。如果 ImmunoCard STAT 检测阴性，有症状的患者还应进行常规寄生虫学检测[128]。Triage Micro parasite panel[Biosite Diagnostics，Inc.（Alere）]是一种快速免疫学检测方法，不仅可以检测粪便标本中的十二指肠贾第鞭毛虫抗原，还可以检测溶组织内阿米巴/迪斯帕内阿米巴及微小隐孢子虫抗原[130]。粪便标本中的抗原被固定在一层膜上，待检粪便标本中每种原虫的抗原可被膜上相应肠道原虫的特异性抗体识别。如果粪便中存在某种原虫，便会在膜上特定的区域显色。操作前，实验室人员应检查产品包装说明书，以确定样本（固定或新鲜样本）是否适合相应的检测。Quik Check（TechLab）也可用于快速诊断贾第鞭毛虫和隐孢子虫感染。虽然目前已有多种方法用于十二指肠贾第鞭毛虫检测，但在选择一个特定的方法前，应考虑工作量大小、技术人员的技能水平、必要的设备及试验方法的性能特点等[131]。第 138 章有关于临床实验室检测贾第鞭毛虫检测方法的列表。Soares 等最近写了一篇关于几种贾第鞭毛虫临床样本的各种方法检测及其性能特点的综述[116]。

（3）核酸检测：一些分子生物学技术已经用于临床样本十二指肠贾第鞭毛虫感染的检测[1,2,57-58,102,132-141]，表 143-4 列举了一些通过 FDA 批准的检测方法。有团队研发了寡核苷酸微阵列芯片技术用于检测粪便标本中十二指肠贾第鞭毛虫等肠道寄生虫感染，其敏感性和特异性均很高，该方法还可区分贾第鞭毛虫 A 型和 B 型集聚体[142]。多重 PCR 技术也可以检测十二指肠贾第鞭毛虫特定基因型，该法可用于暴发的流行病学调查[25]。研究发现，与 DFA 以外的 in-house PCR 和双向测序相比，BD MAX 检测的敏感性为 98.2％，特异性为 99.5％[2]；与 PCR 和测序相比，BioFire FilmArray GI 试剂盒的敏感性为 100％，特异性为 99.5％[1]。需要注意的是，有研究显示冷冻标本使用 BD MAX 测定时敏感性下降，可能混淆结果[139]。

由于城市供水系统可能遭受污染，因此，水中寄生性原虫监测需作为一项公共卫生管理措施。十二指肠贾第鞭毛虫包囊可在冷水中存活 2～3 个月，常规的氯气处理难以杀灭。DFA 试验常用于检测水样中的十二指肠贾第鞭毛虫包囊，PCR 方法也可以用于检测[143]。PCR 的优势在于比荧光试验和特殊染色方法具有更高的敏感性。但仍需继续开展水污染检测技术的研究，以提高检测活病原体的能力，因为活病原体是劣质水质的关

键指标[144]。

6. 治疗　确诊的贾第鞭毛虫病患者一般选用甲硝唑、替硝唑或硝唑尼特[69]。也可用其他药物如巴龙霉素、呋喃唑酮、阿的平或甲硝唑类药物如奥硝唑和塞克硝唑[145]。大多数免疫功能正常患者的感染表现为自限性，治疗目的是缩短症状的持续时间和防止病原体传播。其他治疗药物有阿苯达唑、甲苯咪唑和杆菌肽等[146]。其他治疗方法正在尝试阶段。阿苯达唑、甲苯咪唑和巴龙霉素对贾第鞭毛虫的杀伤作用弱于硝基咪唑类药物[145]。临床和体外实验均已观察到贾第鞭毛虫对甲硝唑和其他药物的耐药性[70]。体外耐药性试验虽有意义，但临床实验室尚缺乏标准规范[147]。

7. 结果的评价、解释和报告　如本章中提到的任何一种原虫一样，评估是否有十二指肠贾第鞭毛虫的感染，至少需检测1份以上的粪便标本。对于贾第鞭毛虫而言，为了提高检出率，有时可能需要检测5～6份粪便样本，这对于诊断十二指肠贾第鞭毛虫感染尤为重要，因为虫体可按不同周期在粪便标本中间断排出。在制片染色过程中，包囊会缩小或变形，这可能会影响实验人员对涂片的判读。已有几种技术可用于临床实验室对贾第鞭毛虫病的诊断。有些方法虽可提高检测敏感性，但需要适应实验室的整体工作流程。EIAs可提高敏感性，但由于受检患者群体中可能有其他病原体，故不能取代寄生虫学检查。如果医生增加其他一些检测方法，如EIA或核酸扩增检测，同时又做常规寄生虫学检查，可能会增加检测的成本。

(七)脆弱双核阿米巴

1. 分类　脆弱双核阿米巴目前属于古虫界，后滴门，副基体纲，毛滴虫目[148]，见第135章。

2. 病原体描述　尽管脆弱双核阿米巴缺失外鞭毛，以往曾归属于阿米巴，但目前被归属于鞭毛虫。电子显微镜和抗原性分析结果为其分类提供了证据，表明其与毛滴虫(*Trichomonas*)和组织滴虫(*Histomonas*)内的虫种关系密切，对小亚基rRNA序列的系统发育分析也证实了脆弱双核阿米巴和组织滴虫的相关性[149-150]。脆弱双核阿米巴有滋养体、包囊前体和包囊3个阶段[148, 151]，过去常将脆弱双核阿米巴的退化形式与包囊前体形式相混淆[148]。多年来，人们普遍认为脆弱双核阿米巴没有包囊形成，啮齿动物模型证实存在包囊。据文献报道，2013年小鼠口服接种后检测到包囊[152]，2014年在人类标本中发现了脆弱双核阿米巴包囊[151]。作者认为，在人类标本中罕见的包囊形式可能表明包囊不是脆弱双核阿米巴的主要传播形式[148, 151]。

3. 流行病学、传播和预防　脆弱双核阿米巴呈世界性分布，可引起人体非侵袭性腹泻病。目前文献认为脆弱双核阿米巴有2种基因型：基因型1和基因型2，基因型1似乎最常见[148]，在人体的定植与其他肠道寄生虫相似，通常盲肠和结肠近端受累。目前，关于脆弱双核阿米巴的传播方式仍然不甚明确，有研究者推测本虫是与蛲虫卵或蛔虫卵一起传播[153]。多项研究结果为蛲虫卵作为传播媒介提供了详细证据，2种原虫混合感染率高于预期[154]。

近期的很多研究支持脆弱双核阿米巴通过蛲虫传播[155-156]。虽然其DNA存在于蛲虫卵中，但一些研究人员认为这并不能证明脆弱双核阿米巴DNA的生存能力，需要更多的动物研究证明蛲虫卵可以引起脆弱双核阿米巴感染[157]。Munasinghe等通过动物实验表明，对脆弱双核阿米巴感染而言，蛲虫并不是绝对需要的[152]。

虽然脆弱双核阿米巴呈世界性分布，但其感染率各地区差别很大，从捷克布拉格的0到德国的42%不等[154]。某些特定人群的感染率更高，如传教士、居住在亚利桑那州的印第安人、被社会福利机构收容者等[158]。美国的感染率很低，究其原因可能为临床标本中本虫鉴定困难而造成的漏报。此外，Johnson和Clark[159]鉴定了本虫2个不同基因型，它们之间的序列差异约为2%[159-160]。这种差异程度似乎与溶组织内阿米巴和迪斯帕内阿米巴之间的差异相似。由于无症状感染的存在，这一研究结果支持存在2种不同种的假说，但尚未在学界内达成共识[154, 159]。

4. 临床表现　成年人有症状感染率为15%～25%，儿童感染更为普遍。感染者中90%以上有临床症状[104, 161-162]，包括疲劳、体重下降、腹泻(常呈间歇性)、腹痛、厌食和恶心等。有研究表明，脆弱双核阿米巴感染常伴有胆道感染[163]、肠易激综合征[29]、过敏性结肠炎[164]和HIV感染者腹泻[165]，曾有本虫感染导致急性阑尾炎的病例报道[166]，某些患者(主要是儿

童)会发生不明原因的外周血嗜酸性粒细胞增多[6,167]，并于感染后1～2周发生腹泻，与其他肠道原虫相似，体内脆弱双核阿米巴虫体数目每天可发生很大变化，腹痛可持续1～2个月[161]。虽然脆弱双核阿米巴会引起上述临床症状，但仍可从无明显临床症状患者体内分离出虫体。此外，由于尚缺乏动物模型，影响了研究人员对病理表现更为详尽的观察[154]。

5. 直接检测

(1)显微镜检查：脆弱双核阿米巴感染的诊断与其他肠道原虫相似，只有从新鲜或保存的粪便标本检出滋养体才能确定感染。直接显微镜检查可能难以检出虫体，因为在未固定标本中，滋养体可能很快变形或崩解。未固定的滋养体会变成圆形并具折光性，在显微镜下更难识别。滋养体有1个或2个核(双核)，双核更为常见(表143-5，图143-7和图143-9)。许多固定剂和着色剂可以使用，但番红和经过处理的铁苏木素似乎是最佳组合。Stark等详细讨论了脆弱双核阿米巴适合的固定剂和染色剂[148]。

(2)其他诊断方法：培养技术比显微镜检查具有更高的敏感性，但不推荐用于临床实验室常规检测[154]。脆弱双核阿米巴是通过外源性培养系统完成培养的，虫体与患者粪便标本的菌群同时生长，无菌培养不支持其生长[148]。抗原和抗体检测技术已被作为脆弱双核阿米巴的诊断工具，但尚未有商业化试剂盒[58,168-169]。PCR技术已用于新鲜的未经保存的粪便标本中脆弱双核阿米巴DNA的检测。分子生物学技术比显微镜检敏感性高[58,170-172]，且用于检测脆弱双核阿米巴的多重PCR正在研发之中[58]。有多种PCR检测方法可用于检测脆弱双核阿米巴[148,173]，但还没有获得美国FDA批准，其中一种方法的敏感性为92%～100%，特异性为100%，显示出应用分子技术检测该病原体的巨大潜力[173]。

6. 治疗 Stark等完整总结了脆弱双核阿米巴的治疗药物[148]。美国常用双碘喹啉(iodoquino，或称二碘羟嗪)，但其作用原理并不清楚[148,174]。CDC基于有限的文献报道病例，推荐四环素[175]。替代药品有巴龙霉素、甲硝唑等[174]，其他的治疗方法包括双硫醚、卡巴松、红霉素、羟基喹啉和塞克硝唑[154,176]。值得注意的是，虽然目前有几种治疗药物被用于治疗阿米巴

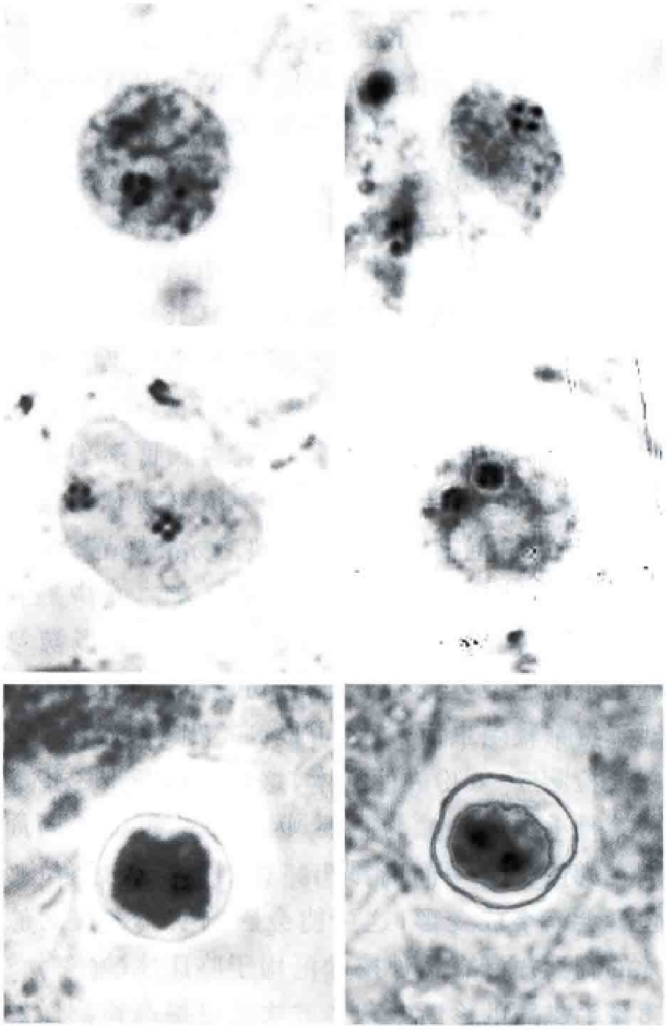


图143-9 上行：脆弱双核阿米巴滋养体(注意单个、碎片状核；如果细胞核还没有分裂，将类似于微小内蜒阿米巴)。中间行：脆弱双核阿米巴滋养体(注意两个分裂的细胞核)。下行：脆弱双核阿米巴包囊(注意囊壁皱缩；人类粪便涂片上只有约1%的包囊，因此诊断仍依赖于染色涂片上的滋养体形态)。除了右边有两个细胞核的滋养体用铁苏木素染色外，其余均为Wheatley三色染色(由L. Garcia提供)，见彩插

病，但鲜有上述大多数药物的随机、双盲和对照试验[148]。有一项随机、双盲、安慰剂对照临床试验发现，儿童使用甲硝唑治疗与临床疗效改善无关[177]。如果同时检测出蛲虫感染，患者也应接受相应的治疗[161]。

7. 结果的评价、解释和报告 为提高脆弱双核阿米巴的检出率，至少需要采集3份粪便样本[4,104]。成形软便中可检出滋养体，提示需对各种类型粪样的检测结果进行评估[161]。脆弱双核阿米巴在社区的流行低可能是由于当地实验室无法准确识别虫体。

(八)阴道毛滴虫

1. 分类　阴道毛滴虫是一种鞭毛虫，属于古虫界、后滴门、副基体纲、毛滴虫属(第 135 章)。与其他鞭毛虫寄生于肠道不同，阴道毛滴虫主要感染泌尿生殖道。

2. 病原体描述　阴道毛滴虫生活史仅有滋养体期而无包囊期。形态上与其他毛滴虫相似，呈梨形，以显著的轴柱和波动膜为其特征，后者伸至滋养体侧面一半处(表 143-5，图 143-7 和图 143-10)。它是一种兼性厌氧生物，二分裂繁殖，在宿主体外不能长时间存活。

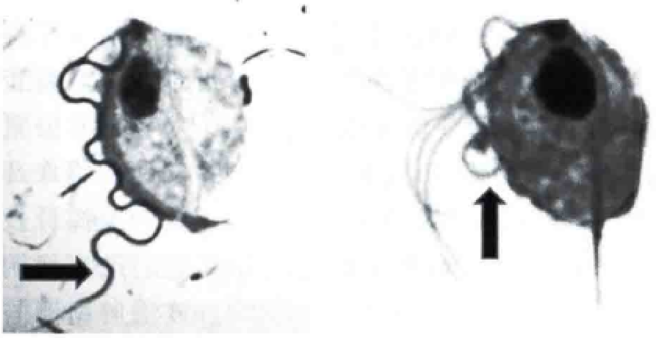


图 143-10　左：人五毛滴虫(注意波动膜，箭指向虫体的底部)，右：阴道毛滴虫(注意波动膜，箭指在虫体的中间)。两图均为 Giemsa 染色(由 L. Garcia 提供)，见彩插

3. 流行病学、传播和预防　阴道毛滴虫是一种感染男性和女性泌尿生殖道的致病鞭毛虫。感染主要通过性传播。据 CDC 公布，阴道毛滴虫是美国最常见的非病毒性传播疾病，估计感染例数为 370 万/年[175]。阴道毛滴虫也是性活跃的年轻女性最常见的可治愈的性传播疾病。全球每年滴虫性感染可达约 2.5 亿例，估计总患病率为 4.5%[178]。女性患病率(8%)高于男性(1%)[178-179]，推测女性体内激素可能在女性滴虫感染率和感染持久性中起很大的作用。不同的调查中阴道毛滴虫病的发病率不同(5%～60%)，社会经济地位较低、多个性伴侣和个人卫生不良等是导致发病率较高的因素。研究表明，高滴虫感染率见于老年妇女[180-182]。这与其他常见的性传播疾病不同，如衣原体通常是年轻女性的患病率高。某项研究的统计结果显示，男性患病率为 6.6%，但平均年龄为 39.9 岁的男性患病率较高[180]。这与上述女性感染有相似之处。一些研究已经证实了阴道毛滴虫和前列腺癌之间的关系[183-185]。研究人员正在探索一种能够确定前列腺癌高危人群与阴道毛滴虫血清学阳性有关的血清学诊断试验[186]。

文献估测感染率较低的可能原因：①在美国和其他国家阴道毛滴虫病不是一种法定报告的疾病；②阴道毛滴虫感染，尤其是男性感染可无症状；③实验室诊断敏感性不同。尽管其感染率很高，且感染后可引起严重后果，但滴虫病并未受到公共卫生和性传播疾病预防规划的足够重视[187]。在美国 CDC 将阴道毛滴虫归为被忽视的寄生虫感染。

4. 临床表现　女性感染可导致阴道炎、子宫颈炎和尿道炎[187]。典型的症状有阴道分泌物量多、液态、浅绿色、多泡沫和恶臭。有些突发症状如剧烈的阴道及外阴瘙痒和分泌物排出，常见于月经期间或之后。女性感染者阴道 pH 常高于正常值 4.5。20%的女性感染者发生排尿困难。孕妇感染常伴发胎膜早破、早产、其他不良妊娠结局和子宫切除术后穹隆感染[188-190]。高达 50%感染女性为无症状携带者。男性最常见的症状表现为尿道炎，大多数男性感染者无症状，无症状携带者可作为传染源，并存在发病的风险。未经治疗的毛滴虫感染可持续数月甚至数年[191]。滴虫病可作为艾滋病毒传播的辅助因素[192-193]。研究表明有症状的滴虫性尿道炎男性患者精液内 HIV 浓度高于无尿道炎的男性 HIV 感染者[194]。CDC 建议对感染 HIV 的妇女进行阴道毛滴虫的常规筛检，因为这些不良事件与 HIV 和阴道毛滴虫的感染有关[195]。然而，目前不推荐常规筛查无症状感染的阴道毛滴虫，可以考虑在惩教所或性病诊所等高危环境中筛查无症状患者。目前，没有数据支持在这些高危环境中进行常规筛查，也没有数据显示这些社区的感染负担是否会受到影响[195]。一些研究表明，选择不同的滴虫检测方法可能导致感染率存在差异。在一项研究中，快速 OSOM 检测(下文将详细讨论)在低感染率环境下效果欠佳，因此建议采用分子方法进行检测[196]。

新生儿在经过感染的产道时可被感染[187]，曾有报道阴道毛滴虫引起新生儿肺炎[197]。最近有男性患者感染阴道毛滴虫引起双侧结膜炎的病例报道，但患者并无生殖器感染[198]。有 1 例癫痫和多器官衰竭的新生儿发生脑滴虫病，从其脑脊液

中分离出阴道毛滴虫[199]。多位点序列分型技术已用于鉴定阴道毛滴虫，这些技术可用于人群研究及未来研发疫苗的虫种选择[200]。

5. 直接检测

(1)显微镜检查：阴道毛滴虫感染的诊断一般取阴道及尿道分泌物、前列腺分泌物和尿沉积物直接涂片镜检。永久性染色如巴氏(Papanicolaou)和吉姆萨(Giemsa)染色也可用于诊断，但难以识别虫体[201]。用于制备湿片的阴道分泌物样本一般在内镜检查时采集，但研究表明，自采标本或用棉签采集样本均可使用[202-203]。将样本与一滴生理盐水混匀，在 1 h 内用低倍镜(放大倍数，×100)暗视野检查。采集的样本绝对不能冷藏，观察到跳跃式运动的虫体即为阳性。滋养体运动减弱时可观察到波动膜的运动。涂片内常可见多形核细胞。涂片检查的阳性率在 50%～70%，检查结果与镜检者技能和其他因素有关，男性感染的显微镜检查敏感性低，需要其他的检测来增加敏感性，如尿道拭子、尿和精液的培养。影响敏感性的最重要因素可能是样本采集至检测的时间，阴道毛滴虫运动作为虫体活力检查的关键因素，随着送检时间延迟而逐渐减弱。Amies 运输培养基能在室温下保持拭子上阴道毛滴虫活力，在培养接种前可保持(24±6)h[204]。由于阴道毛滴虫的形态与非致病鞭毛虫人五毛滴虫非常相似，故必须确保样本不受粪便污染。

(2)培养：培养法比直接涂片法敏感性更高(>80%)，是阴道毛滴虫检测的金标准。必须正确收集样本并立即接种到合适的培养基，如改良 Diamond、Trichosel 或 Hollanders 培养基。由于此法费用较高且操作烦琐，并非常规使用。InPouchTV 培养系统和 Empyrean 诊断系统可以直接接种、转运、培养和镜检，目前已实现商业化[205-206]，不能立即运输标本的情况下，应鼓励使用这些运输或培养设备。研究还表明，延迟接种与立即接种的敏感性一致。对培养结果可以采用显微镜检查以确定是否需要继续培养[207]。血清学试验不适用于阴道滴虫病的诊断。

(3)抗原检测：几种抗原检测方法已经用于阴道毛滴虫的检测，具有快速和操作简便的优势。已证明胶乳凝集试验(TV Latex；Kalon Biological，Guildford，Surrey，United Kingdom)具有良好的敏感性[208]，但尚未在美国使用。在美国，免疫荧光法直接用于检测患者样本。商业化的免疫层析毛细管流式检测可定性检测阴道拭子中的阴道毛滴虫抗原。OSOM 滴虫快速检测试剂盒是一种定量检测试验，可在 10 min 内获得结果。据文献报道，与其他检测技术如湿片检查、培养法和基因扩增试验相比，OSOM 试验具有良好的敏感性(67.0%～94.7%)和特异性(98.8%～100.0%)[209-215]，此检测方法更适合门诊快速检测需要[216]。目前正在研发一种阴道毛滴虫的现场快速筛查试验，可用于检查阴道毛滴虫，该方法具有新颖的电化学末端检测特点，初步研究结果显示具有高度敏感性和特异性[217]。

(4)核酸检测：各种核酸检测技术可用于临床标本中阴道毛滴虫的检测。方法的选择取决于许多因素，包括分子检测是否更佳和即时检测是否必要，例如，当患者可能不再回到医生的办公室(性传播疾病诊所)或其他没有随访问题的临床环境。Affirm VP Ⅲ检测是一种直接 DNA 探针技术(无需扩增)，可用于阴道炎和其他阴道疾病阴道拭子样本的病原体检测[218-220]。该法可检测与阴道分泌物增多有关的 3 种最常见疾患：细菌性阴道炎(阴道加德纳菌，*Gardnerella vaginalis*)、念珠菌阴道炎(白念珠菌，*Candida albicans*)和滴虫性阴道炎(阴道毛滴虫)，该产品说明书介绍，与湿片镜检和阴道滴虫培养相比，该法的敏感性和特异性分别为 90% 和 98%(package insert，Affirm VP Ⅲ，version no. 670160JAAG；Becton Dickinson)。一项临床评价结果表明，有症状和无症状女性阴道拭子样本的检测结果显示，Affirm 法检出的阴道毛滴虫阳性样本数比湿片多，但两者差异未显示明显的统计学意义[221]。需要注意的是，Affirm VPⅢ检测(Becton Dickinson)的敏感性低于分子检测[181,220,222-223]。Andrea 和 Chapin 比较了基因探针法 ATV[(Hologic) Aptima *T. vaginalis* (ATV) (Hologic)]和 Affirm VPⅢ法(Becton Dickinson)，结果发现，ATV 法的敏感性为 100%，Affirm VPⅢ法为 63.4%[181]。

核酸扩增试验已用于阴道毛滴虫的检测。过去几年的许多数据显示，这一方法优于其他毛滴虫感染的临床诊断方法[182,187,211,224-235]。在美国，目前有 5 种 FDA 认证的用于检测阴道毛滴虫的分子扩增检测方法：①Xpert TV(批准用于男性尿、女性子宫颈内及阴道自检拭物)；② Quidel

Solana Trichomonas assay(批准用于女性阴道和尿标本);③ATV assay(批准用于男性尿和女性阴道拭子和尿标本);④BD ProbeTec TV assay(批准用于女性子宫颈内拭子、院内收集的患者阴道拭子和女性尿标本);⑤ the BD Max vaginal panel 和 the BD Max CT/GC/TVassay(分别批准用于阴道拭子或女性子宫颈内拭子、阴道拭子、尿和男性尿标本)[236-238],这些方法大多数也都有 CE 认证。Cepheid 公司的 Xpert TV assay 是在 GeneXpert 系统上使用的一种基于 PCR 技术的阴道毛滴虫检测方法,是 FDA 唯一批准的用于无/有症状的男/女性样本的检测方法[216,236,239],检测时间约为 40 min。Quidel Solana Trichomonas assay(在 Solana 仪器上完成)应用解链酶扩增技术和荧光探针技术,能快速检测有症状和无症状患者的阴道和尿标本,检测时间少于 40 min[240]。Hologic ATV assay 能在自动化的 Panther 和 Tigris 上进行,检测效能优于其他标准方法[181-182,235]。ATV 法通过转录介导扩增检测 rRNA,已被批准用于多种样本的检测,如临床采集的阴道样本、宫颈内拭子、含有细胞的稀薄液体样本和尿样本[235]。除了对成人进行检测外,分子检测也被用于检测儿童标本中的毛滴虫[241]。有学者用 ATV 试剂检测直肠或肛门拭子,诊断肛门直肠部位阴道毛滴虫感染[180,242]。有研究比较了 Affirm VPⅢ与 Hologic ATV 测定,发现 ATV 的敏感性为 98.1%,而 Affirm VP Ⅲ 的敏感性为 46.3%[220]。Becton Dickinson 公司有一种称为 BD T. vaginalis Qx 的分析方法,可以在他们的自动化 BD Viper 系统上进行阴道毛滴虫检测。一项研究发现,与患者感染状态相比,该方法的敏感性和特异性分别为 98.3% 和 99.0%[238]。BD Max 还能用于淋病奈瑟菌、沙眼衣原体和阴道毛滴虫的多重检测[237]。在美国以外地区可以买到的是 Seeplex Anyplex Ⅱ sti5 检测试剂盒(Seegene, Seoul, Korea),可用于检测阴道毛滴虫和其他病原体[243]。该方法实际是一种多重 PCR,以针对特定基因的 6 对寡核苷酸为引物对病原体进行检测。目前,尚不清楚该试验将来能否在美国获得 FDA 批准。与 Affirm VPⅢ类似,Becton Dickinson 在 BD Max 上有另一个阴道滴虫测定试剂盒,它是一种定性 PCR 检测,使用荧光靶向特异性杂交探针,扩增特定的 DNA 目标,如与细菌性阴道病相关的某些念珠菌和阴道毛滴虫等原虫和其他微生物。标本采集是通过 BD Max UVE 完成的,它是检测系统的一部分。Gaydos 等报道称,BD Max 对滴虫检验的敏感性达 93.1%,特异性为 99.3%。无论医生采集的标本还是患者自行采集的标本,其敏感性和特异性均相似。在盆腔检查可能较为困难的情况下,可以考虑患者自行采集标本[244-245]。

虽然湿片检查可快速得到结果,且价格低廉,但由于阴道毛滴虫感染对妊娠有严重影响及其与 HIV 传播有关联,可能需用敏感性较高的方法进行检测,如核酸探针和扩增试验[204,233]。使用其他标本类型,如尿,使得扩增检测成为诊断滴虫病的一个重要进步。将湿片检查阴性的标本进行培养或选择敏感性更高的方法检测可能更好[212]。由于阴道毛滴虫的真实感染率尚不确定,且似乎老年女性感染率更高,因此对实验室人员和临床医生而言,均需了解哪些患者应该进行筛检[182]。

6. 治疗 治疗阴道毛滴虫感染推荐使用甲硝唑或替硝唑[69,246]。甲硝唑的口服疗效优于局部用药。替硝唑可作为一线药物,或用于之前甲硝唑治疗未愈的难治性病例[247]。对于妊娠期妇女,甲硝唑虽为首选药物,但应慎用。资料表明,甲硝唑治疗并不能减少围产期发病率[246,248]。所有感染者的性伴侣也需接受治疗。甲硝唑治疗失败最常见的原因是依从性差或再感染。甲硝唑的耐药性早已出现并有逐渐增加的趋势[247,249]。虽然不常规应用,但已有体外敏感实验方法的报道。这些方法还未被标准化,检测结果可能会因检测条件的不同而异[250-251]。

7. 结果的评价、解释和报告 如果实验室检查结果显示阴道毛滴虫阳性,可考虑诊断为阴道毛滴虫病。如前所述,若因样本采集及运输问题,可导致直接镜检及培养的敏感性较低。因此,实验室应拒收未在规定时间内送至和未达送检条件的毛滴虫培养和涂片样本以提高检测的敏感性和准确性。镜检、培养和抗原检测的敏感性低于分子检测,因此,任何一种方法的阴性结果都需谨慎考虑,并结合临床症状进行评估。

滴虫检测实验如抗原检测、直接分子探针或基因扩增试验的结果,需进行分析说明。例如,用 DNA 探针直接检测阴道毛滴虫所得的阳性结果,

应说明是“检测到阴道毛滴虫 DNA”。如使用其他样本进行检测，例如，用基因扩增方法检测尿，报告中应明确说明所测样本的类型。

在美国如果使用自行研发的方法用于阴道滴虫的诊断，要求结果贴上状态标签，标明其是一个内部测试，按照 CLIA 规定如下：“这个检测的开发及其性能特征由(实验室名称)判定，还没有得到美国 FDA 的批准”。该说明也适用于经 FDA 批准的检测方法超范围使用，如特定采样时间未经生产商验证时。在任何患者报告之前，任何未经过生产商验证的样本类型分析的超说明书使用都需要进行实验室内部验证。

五、非致病性鞭毛虫

迈氏唇鞭毛虫(*C. mesnili*)呈全球性分布，一般认为无致病性。与脆弱双核阿米巴不同，该虫既有滋养体期，也有包囊期。宿主摄入被包囊污染的食物或水而感染，虫体进入人或动物体内，寄生在盲肠和(或)结肠。滋养体大小为 6～24 μm，具有特征性的沿虫体纵向分布的螺旋沟(表 143-4，图 143-7 和图 143-11)。该虫运动状态偶可在新鲜的直接涂片中见到，螺旋沟可在虫体旋转时暴露出来。鞭毛在染色片中难以见到。滋养体含有 1 个核，与胞口或口沟非常接近。梨形包囊内有滋养体的胞质脏器，含有单个核和弧状的胞口纤丝。永久性染色涂片中的虫体更易识别。

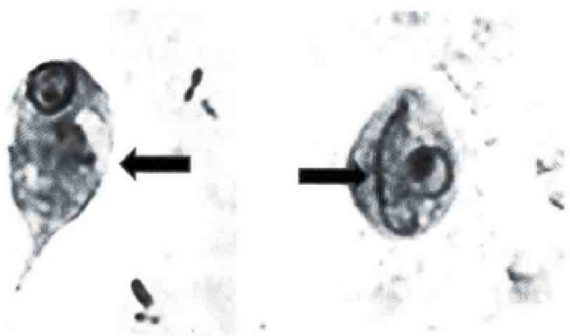


图 143-11 左：迈氏唇鞭毛虫滋养体(注意箭所示清晰的饲料槽或胞口)右：迈氏唇鞭毛虫包囊，注意箭所示弯曲的纤丝，即“牧羊人之杖”；还要注意典型梨形或柠檬形的包囊。均为 Wheatley 三色染色(由 L. Garcia 提供)，见彩插

人五毛滴虫(*P. hominis*)，原名为人毛滴虫(*Trichomonas hominis*)，仅观察到有滋养体的非致病鞭毛虫。尽管该虫全球均有分布，并在腹泻患者中发现，但仍为非致病性的。滋养体一般寄生在盲肠，虫体呈梨形，含 1 个与虫体等长的波动膜。推荐采用永久涂片观察临床标本中的虫体。滋养体可能在染色涂片中着色较浅而难以发现[6]。

另外两种非致病性肠道滴虫是人肠滴虫(*E. hominis*)和肠内滴虫(*R. intestinalis*)，两者均见于温带地区，因摄入包囊导致感染。检查临床标本时，应注意人肠滴虫包囊与微小内蜒阿米巴类似，尽管后者罕见且有 2 个细胞核。但因为人肠滴虫和微小内蜒阿米巴很小，即使在永久性染色涂片中也难以检测到虫体，因此，可能会导致漏报。有研究报道，1 例轻微胰腺管病变患者的胰液中曾经检出肠内滴虫[252]。

对非致病性鞭毛虫感染一般不予治疗，改善个人卫生和环境卫生是预防感染的关键。如果非致病性滴虫存在于临床标本中，与肠道非致病性阿米巴一样，重要的是报告其存在。它们的存在可能表明接触了受污染的食物或水源，可能需要进行其他病原学的相关检测。

六、纤毛虫

(一)结肠小袋纤毛虫

1. 分类 结肠小袋纤毛虫(*Neobalantidium coli*)属于 SAR 超群、纤毛虫门、直口纲(第 135 章)。纤毛虫门的成员的生活史至少有一个阶段具有纤毛。虫体有 2 种不同类型的胞核，一种是大核，另一种是一个或多个微核。近年来，通过分子生物学分析研究描述了小袋纤毛虫属(genus Neobalantidium)的特征[253-255]。该属 rRNA 小亚基基因序列已登载 GenBank。目前，尚不能确定从人和猪分离的虫种是否是同一虫种[253]。

2. 病原体描述 该虫生活史包括滋养体和包囊两个阶段(表 143-6，图 143-12)。包囊为感染阶段，包囊被宿主食入后脱囊，形成滋养体，并借助分泌的透明质酸酶入侵组织。滋养体呈卵形，周身披有纤毛，虫体在直接涂片低倍镜下极易看到。胞质内包含 1 个大核和 1 个微核，另有 2 个可收缩的液泡。在新鲜的涂片中可观察到活动的滋养体，但须在样本采集后立即观察。滋养体略呈梨形，内含食物泡，其内可见细胞碎片和吞噬的细菌。当滋养体下行至大肠便形成包囊。

表 143-6 结肠小袋纤毛虫的主要特点

生活史阶段	特点
滋养体	形状和大小：卵圆形尖细的前端；长 50～100 μm，宽 40～70 μm
	运动：旋转，单调；可快速
	核：1 个大的肾豆状核，未染色涂片可能呈现不同形态；1 个圆形小微核，与大核相邻，很难看到
	细胞质：可能含有液泡；摄入细菌和碎屑；前细胞口
	纤毛：身体表面覆盖着纵排纤毛；位于细胞口附近的较长
	注：永久染色涂片可能会与蠕虫卵或碎片混淆，推荐浓缩或沉淀后检查
包囊	形态和大小：球形或椭圆形；直径 50～70 μm
	核：1 大核，1 微核，很难看见
	细胞质：初期包囊内可见液泡；后期包囊内部结构呈颗粒状
	纤毛：在厚壁包囊内难以看见

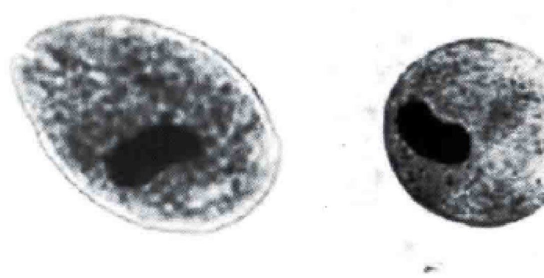


图 143-12 左：结肠小袋纤毛虫滋养体（注意大核，微核不可见）；右：结肠小袋纤毛虫包囊（注意大核，微核不可见）。Wheatley 三色染色（由 L. Garcia 提供），见彩插

3. 流行病学、传播和预防 结肠小袋纤毛虫寄生于猪和黑猩猩等动物体内，猪是主要的宿主[253]。该虫是已知感染人体的唯一致病性纤毛虫，也是最大的致病性原虫。因摄入被包囊污染的食物或水而引起粪-口途径传播。感染多见于气候温和地区，在人与猪密切接触的地区更为常见。如其他肠道原虫一样，不良的卫生状况会导致较高的感染率。纤毛虫流行率因不同的地理区域而异，总体感染率为 0.02%～1.00%[256]。高感染率地区包括中东、巴布亚新几内亚和西伊里安、拉丁美洲和菲律宾等[257-258]。

4. 临床表现 感染结肠小袋纤毛虫的患者多无症状。有症状的感染者可发生类似于阿米巴病样的痢疾[6,259]。结肠小袋纤毛虫感染有如下 3 种表现：①无症状携带者；②慢性感染，无血性腹泻、腹部痉挛及疼痛；③暴发型，排黏液血便[253]。结肠小袋纤毛虫所致结肠炎与溶组织内阿米巴所致肠炎往往不易区分，典型症状包括腹泻、恶心、呕吐、头痛和厌食。体液严重丢失，与隐孢子虫病患者相似。虫体可侵入结肠黏膜下层，并可引发溃疡性脓肿和出血性损伤，由虫体入侵造成的浅表溃疡和黏膜下层损伤易于继发细菌感染，从而给治疗带来困难[260-261]。由侵袭性结肠小袋纤毛虫导致死亡的病例已有报道[260]，有研究报道结肠小袋纤毛虫还可引起肠外感染[260]，有报道称病原体由肠播散至肺，多发生于老年或免疫功能低下者，临床表现类似肺炎，在患者的支气管分泌物和肺泡灌洗液中可检测到结肠小袋纤毛虫，推测虫体可穿入结肠壁或经吸入口腔液体而侵入淋巴及循环系统，从而引发肠外寄生感染[253]。结肠小袋纤毛虫感染导致脊椎骨髓炎和脊髓病为首次报道的骨骼感染病例[263]。结肠小袋纤毛虫在尿路中非常罕见，但在患有慢性肾脏疾病的老人和慢性阻塞性肺疾病的患者中有报道[264-265]。印度患者还首次出现了肝脓肿[266]。尽管极少见，但已有文献报道多发性细菌性角膜炎伴结肠小袋纤毛虫感染[267]。

5. 直接检查 显微镜检查粪便样本中的虫卵和虫体，或肠道活体组织学检查可确认结肠小袋纤毛虫感染。在粪便或组织样本中检测到滋养体即可确诊[262]。在直接涂片和浓集的粪便样本中极易确认滋养体，而在 Wheatley 三色染色永久涂片中很难确认结肠小袋纤毛虫，因为该虫体积很大，且易染色过度，使虫体不易识别造成假阴性。

6. 治疗 尽管被看作是实验性药物，治疗结肠小袋纤毛虫感染一般仍用四环素[69]，在某些病例也可选用甲硝唑或双碘喹啉[6]，或选用广谱抗寄生虫药物硝唑尼特[253]。

7. 结果的评价、解释和报告 尽管结肠小袋纤毛虫呈全球性分布，但在人体不常见。它可引

起肺部感染，检验人员切勿将其与呼吸道标本中活动的纤毛上皮细胞相混淆，它全身披有均匀分布的纤毛，在湿片中运动非常活跃。

七、总结

目前，临床实验室在诊断寄生虫学（diagnostic parasitology）方面有很多可供选择的技术，主要包括显微镜检查、培养法、抗原检测和核酸扩增试验等。这些技术可用于检测寄生于肠道和泌尿生殖道的阿米巴、鞭毛虫和纤毛虫。随着分子生物学的发展，已研发出敏感性更高、特异性更强的检测方法，包括 FDA 批准的试验技术，如从生殖道样本中检测阴道毛滴虫的试验方法，从粪便中检测溶组织内阿米巴、十二指肠贾第鞭毛虫、芽囊原虫及隐孢子虫的多重 PCR。随着越来越多的联合检测方法用于感染性肠胃炎等综合征的诊断，它们的效用和对患者预后的影响将变得更加明确。除了扩增试验外，现场快速筛查试验（rapid point-of-care test）可用于阴道毛滴虫检测。检测结果可为临床医生及时处理患者提供依据。虽然这些新的检测方法效果良好，但因缺乏商业化的可供检测所有相关微生物的产品，临床实验室仍常规使用显微镜检查粪便标本。尽管有些实验室已经使用抗原检测方法，由于该方法不能检出送检粪便标本中所有可能存在的病原体，因而很多实验室仍然依赖于显微镜镜检。众所周知，显微镜检查不能区分致病性和非致病性阿米巴及贾第鞭毛虫的不同基因型。将上述这些新技术与常规检测方法相结合，将有助于提高临床寄生虫学实验室对肠道和泌尿生殖道寄生虫感染的诊断。

参考文献请扫二维码查阅

第144章　囊等孢子虫、环孢子虫和肉孢子虫*

DAVIDS. LINDSAY，LOUIS M. WEISS

（梁宏洁　译；苏建荣、曹建平　审校）

贝氏囊等孢子虫（*Cystoisospora belli*）、卡耶塔环孢子虫（*Cyclospora cayetanensis*）和肉孢子虫属（*Sarcocystis* spp.）为人类肠道球虫，通常归为球虫亚纲，根据原生动物学家当前的分类方式，将其归属为SAR超群：顶复动物门（Apicomplexa）、孢子虫纲（Conoidasida）、球虫亚纲（Coccidia）、艾美球虫目（Eimeriorina）[1-2]。它们的生活史（图144-1至图144-5）、流行病学、治疗和诊断方法各不相同。人粪便中可见球虫卵囊（表144-1），在粪便中查到卵囊（贝氏囊等孢子虫或卡耶塔环孢子虫）或孢子囊（肉孢子虫属）即可确诊。肉孢子虫可在肌肉切片或尸检时采集的肌肉样本中检出。

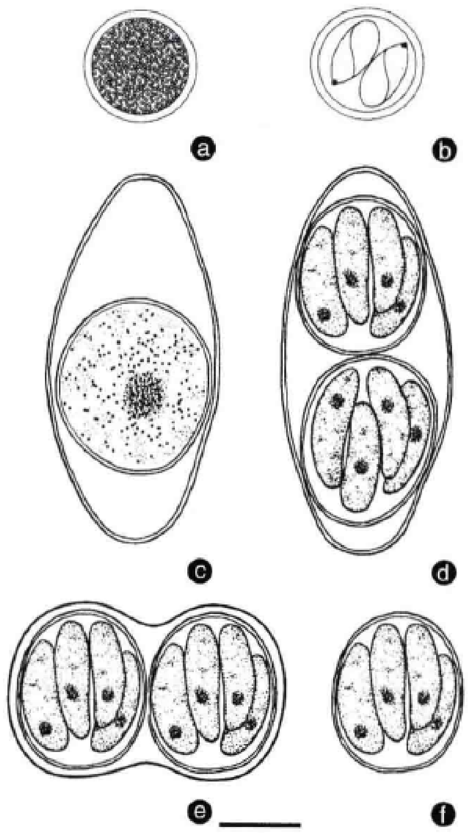


图144-1　未孢子化和孢子化卵囊：卡耶塔环孢子虫（a和b），贝氏囊等孢子虫（c和d）；人肉孢子虫孢子化卵囊（e）和孢子囊（f）。标尺：10 μm

一、分类

利用分子生物学方法评估寄生虫的系统发育和遗传多样性，从而对球虫的分类进行了修正。本章所涉及的肠道寄生虫属于SAR超群：顶复动物门：孢子虫纲：球虫亚纲：艾美球虫目[1-2]，单个寄生虫的英文或拉丁学名称与本书上一版本保持一致。

二、病原体描述

生活史

1. 贝氏囊等孢子虫（*Cystoisospora belli*）　生活史单一（单宿主型），但有证据表明它偶可多宿主寄生（即寄生于2个宿主）。粪便中排出的卵囊均为未孢子化或部分孢子化（图144-1c、d，图144-2a、b）。卵囊的形成取决于温度和湿度，形成时间并不固定，从24 h到5天以上不等，通常在72 h内完成。有报道称样本中贝氏囊等孢子虫有核孢子虫样（Caryospora-like）的卵囊（1个卵囊内仅含1个孢子囊，其内含有8个子孢子）且有高达5%的孢子化卵囊[3]，而一般情况下1个孢子化卵囊内含有2个孢子囊，每个孢子囊内含有4个子孢子。潜伏期，即自摄入孢子化卵囊至在粪便中

*注：本章包含David S. Lindsay和Louis M. Weiss在本手册第11版第141章中呈现的部分内容

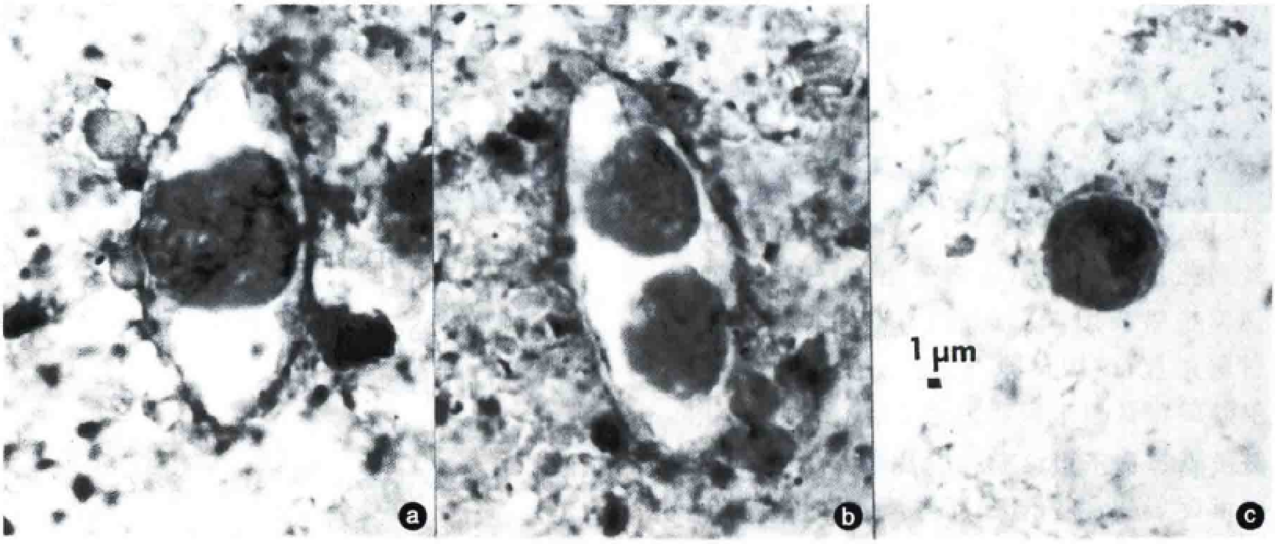


图 144-2 改良 Kinyoun 抗酸染色显示的贝氏囊等孢子虫卵囊，内含 1 个母孢子(a)；囊内含 2 个成孢子细胞的贝氏囊等孢子虫卵囊(b)；内含 1 个母孢子的卡耶塔环孢子虫卵囊(c)。标尺：10 μm，见彩插

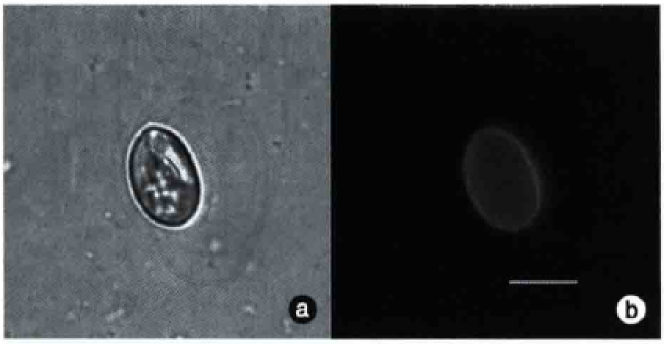


图 144-3 相差显微镜下(a)和紫外线荧光成像(b)粪便样品中的肉孢子虫孢子囊。标尺：10 μm。由 Alice E. Houk，Department of Biomedical Sciences and Pathobiology，Virginia Tech，Blacksburg，VA. 提供，见彩插

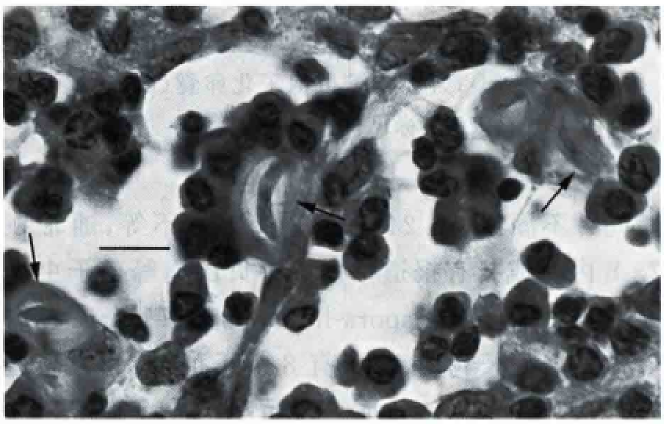


图 144-4 经苏木素和伊红染色的组织切片，显示多个贝氏囊等孢子虫的单生组织囊(箭)。注意包围每个子孢子的厚壁。标尺：10 μm，见彩插

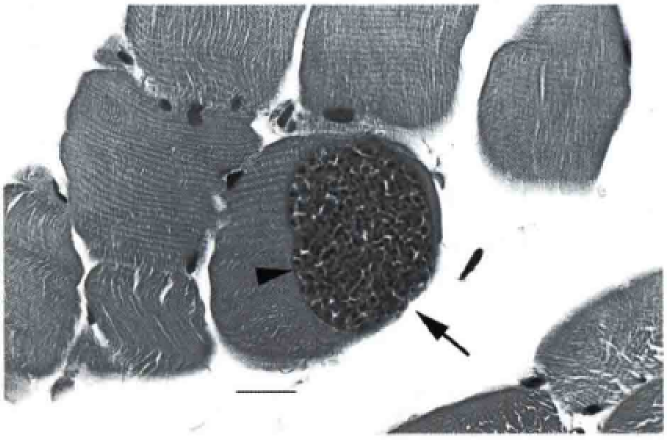


图 144-5 骨骼肌活检标本中的肉孢子虫孢子囊(箭)，包囊壁(箭头)，其内包绕数以百计的裂殖子，组织内无炎性反应。标本采自一位在肉孢子虫病暴发期间到访马来西亚东海岸刁曼岛的荷兰男性游客[49]，其同伴肌肉活检亦呈阳性。标尺：10 μm。由 Douglas H. Esposito and Clifton Drew，National Center forEmerging and ZoonoticInfectiousDiseases，CDC，Atlanta，GA. 提供，见彩插

排出未孢子化卵囊的时间，为 9～17 天[4]；显露期，即从第一次在粪便中排泄卵囊至不能再在粪便中观察到卵囊的时间，其长短取决于感染者的免疫状态，免疫功能正常者通常可在感染后 30～50 天查到卵囊，而免疫功能抑制者，卵囊的排出可持续 6 个月或更久[5]，可反复多次排出。免疫功能抑制者持续排出卵囊可能是由于 1 个或多个裂殖增殖阶段不断循环或肠外单体组织囊被激活所致(图 144-4)。

表 144-1　在人类粪便样本中发现的囊等孢子虫、环孢子虫及肉孢子虫卵囊及孢子囊的结构比较

种属	平均大小(范围)(μm)[a]	
	卵囊	孢子囊
贝氏囊等孢子虫	32×14[(20～36)×(10～19)]	14×10[(12～17)×(7～11)]
纳塔尔囊等孢子虫	不确定[(25～30)×(21～24)]	17×12(不确定)
卡耶塔环孢子虫	9×9[(8～10)×(8～10)]	6×4[(6～7)×(3～4)]
人肉孢子虫	19×15(不确定)	15×9[(13～17)×(8～11)]
猪人肉孢子虫	19×13[(19～20)×(12～15)]	14×11[(12～14)×(10～11)]

注：[a] 数据已经四舍五入为最接近的微米

有报道称在十二指肠和空肠活检标本中可见贝氏囊等孢子虫发育期虫体，偶尔也可见于回肠，卵囊直接从十二指肠内容物中检出。虽然虫体在肠道内的发育主要在上皮细胞，但裂殖体也偶尔见于固有层或黏膜下层[6]。至少可以观察到两代裂殖体，以及大配子体(雌性性阶段)和小配子体(雄性性阶段)，还有未孢子化的卵囊。

贝氏囊等孢子虫的子孢子或裂殖子可在肠外移行，形成休眠状态的单生组织包囊(single-organism containing tissue cysts)(图 144-4)，这些组织包括固有层、肠系膜淋巴结、肝和脾[7-9]，这些包囊通常被称为单生组织囊(monozoic tissue cysts)[7]。在组织切片中可见很厚的囊壁，其大小为(8～10)μm×(12～22)μm，每个囊内含 1 个(8～10)μm×5 μm 大小的休眠子孢子或裂殖子[7-8]。据推测，该组织囊在宿主免疫力减弱时可复苏。当粪便标本中未见卵囊时，单生组织囊可见于肠固有层[9]。在 1 例患有慢性腹泻和播散性单生组织囊的 HIV 感染患者血液涂片中观察到贝氏囊等孢子虫的裂殖子[9]。

因为存在单生组织囊，人们猜测，贝氏囊等孢子虫的生活史中可能存在转续宿主[paratenic (transport) host][7]。已知猫和狗感染贝氏囊等孢子虫时存在转续宿主，转续宿主可能存在于贝氏囊等孢子虫的生活史中。

2. 纳塔尔囊等孢子虫(*Cystoisospora natalensis*)　生活史尚不清楚，但可能为单宿主型。卵囊比贝氏囊等孢子虫卵囊更小、更圆(表 144-1)。随粪便排出的未孢子化卵囊，在外环境温度下，24 h 内形成孢子[10]。纳塔尔囊等孢子虫感染的潜伏期和显露期尚不清楚，而患者排出未孢子化卵囊至少可维持 4 天[11]。但其致病性值得怀疑，因为，迄今仅在南非有患者查到该虫卵囊，而在 1955 年后就再未见此类文献报道[10-11]。

3. 卡耶塔环孢子虫(*Cyclospora cayetanensis*)　生活史为单宿主型，人是唯一宿主。卵囊以未孢子化形式随粪便排出(图 144-1a 和图 144-2c)。在室温(23～25℃)下，少量卵囊可在 10～12 天内形成孢子[12](图 144-1b)，然而许多卵囊需 3～4 周才能使孢子完全发育。孢子化的卵囊含有 2 个孢子囊，每个孢子囊有 2 个子孢子，斯氏体(Stieda body)见于每个孢子囊末端，贝氏囊等孢子虫或肉孢子虫的卵囊内无斯氏体(图 144-1)。目前确切的潜伏期尚不清楚，然而，临床症状一般在感染后的 7～8 天出现，可持续 2～3 周，可为 1～100 天或更长。卵囊随粪便排出的时间长短变化极大，卵囊可在 7 天至数月内随粪便排到任何地方。高达 25%的感染者可发生反复腹泻[13]。原住居民感染主要见于热带、亚热带或暖温带地区。从流行病地区输入污染食品，可引发世界其他区域的暴发与流行。

卡耶塔环孢子虫的发育阶段通常在十二指肠下段及空肠的上皮细胞内[14-16]。在 2 个无性世代之后为有性生殖阶段和卵囊阶段，在肠上皮细胞内的发育阶段位于细胞核上[16]。有实验尝试对 7 名健康志愿者口服感染卡耶塔环孢子虫，随后显微镜检查孢子化卵囊，但并未成功，因为受试者并未出现临床症状，粪便中也无卵囊排出[17]。

4. 人肉孢子虫(*Sarcocystis hominis*)　生活史为多宿主型。人为其终宿主，牛科动物为中间宿主。食入含有肉孢子虫包囊的生或未煮熟的肉类即可感染。常见的中间宿主包括黄牛、美洲野牛、水牛和欧洲野牛。中间宿主体内含有肉孢子虫(肌肉囊)，当人摄入后即具感染性。肉孢子虫的缓殖子(bradyzoites)(类似休眠的裂殖子)具有感染性。缓殖子穿透人体肠道上皮细胞，在肠道固有层细胞中发育为有性期(大配子体和小配子体)，卵囊在固有层细胞中受精后产生孢子。卵囊与囊等孢子虫卵囊相似，含有 2 个孢子囊，每个孢

子囊有 4 个子孢子。当卵囊进入肠腔时囊壁破裂，导致单个孢子囊落入粪便之中（图 144-3），单个孢子囊含有 4 个子孢子。肠道肉孢子虫感染的人粪便中可同时查见 2 个孢子囊的卵囊和单个孢子囊的卵囊（图 144-1e、f）。

排入粪便内的卵囊和孢子囊已完全孢子化。已有报道表明，志愿者的潜伏期为 8～39 天，感染可长达 18 个月之久。人肉孢子虫见于全球各大洲，任何地方的黄牛或水牛只要接触患者粪便，或人进食生或未煮熟污染的牛肉均可感染。

5. 猪人肉孢子虫（*Sarcocystis suihominis*） 生活史类似于上述的人肉孢子虫，猪为本虫的中间宿主，潜伏期为 9～10 天，最长可达 36 天。猪人肉孢子虫见于各大洲，凡存在猪与人粪便接触及人进食生的或未煮熟的猪肉的地区均有分布。

6. 肉孢子虫肌肉感染 据报道，全球有近 100 例在人的骨骼肌和心肌的组织切片内偶然检测到肉孢子虫，因食入被肉孢子虫孢子囊污染的食物或水而感染。一到两代囊前期裂殖增殖可能出现在全身毛细血管内皮细胞内，末代裂殖子穿入横纹肌细胞转化为母细胞，母细胞以孢内生殖方式在肌囊肿内产生缓殖子。毛细血管内皮细胞内的裂殖生殖和宿主肌肉内发育中的肉孢子虫囊可刺激机体出现临床症状（如嗜酸性肌炎）。人体肌肉中有几种不同结构类型的肉孢子虫孢子囊[18]，意味着多种终宿主可以产生对人类具有感染性的孢子囊，部分孢子囊与非人类灵长类动物中的相似[19]。有报道称在前往马来西亚旅游并患上肉孢子虫病的患者肌肉活检中检测到内氏肉孢子虫 DNA[20]。人们认为猴子是内氏肉孢子虫的中间宿主，蛇是终宿主。

三、流行病学、传播和预防

1. 贝氏囊等孢子虫（*Cystoisospora belli*） 贝氏囊等孢子虫主要分布于热带、亚热带和暖温带地区，温带地区亦有感染病例报道。大多数情况下，温带地区的感染病例主要为出境旅行者或肛交者，可通过摄入孢子化卵囊或食入生肉、未煮熟的中间宿主肉制品而传播。1977 年，智利安托法加斯塔贝氏囊等孢子虫感染暴发与摄入污水灌溉的蔬菜有关，受累患者约 90 人[21]。改善流行病区的卫生和水质将减少该虫的传播。

2. 卡耶塔环孢子虫（*Cyclospora cayetanensis*） 卡耶塔环孢子虫流行于中美洲和南美洲、加勒比海、墨西哥、印度尼西亚、亚洲、尼泊尔、非洲、印度、欧洲南部和中东地区。在流行区，与土壤[22]和水[23-24]接触可增加卡耶塔环孢子虫感染的风险。环孢子虫病在美国是全国均需上报的疾病，卫生保健部门应向公共卫生当局报告疑似和确诊病例。卫生保健部门必须对卡耶塔环孢子虫进行检测，因为美国的大多数实验室在对粪便进行寄生虫检测的时候并没有例行检测卡耶塔环孢子虫。在多数温带地区，感染发生主要与食用受污染的进口水果和蔬菜（如罗勒、覆盆子、生菜、沙拉菜和荷兰豆等）有关。2013 年夏季，美国发生过 2 次环孢子虫病大暴发[25]，第一次大暴发主要发生于爱荷华州（153 例）和内布拉斯加州（86 例），与食用餐厅的生菜沙拉（含生菜、莴苣生菜、红卷心菜和胡萝卜）有关[25]；第二次大暴发则发生在得克萨斯州（278 例），与某餐厅的新鲜香菜有关[25]，一家餐厅的 30 位客人中有 22 人被感染。美国 CDC 报道，2017 年卡耶塔环孢子虫病感染有所上升，仅 2017 年 10 月的报告数就达到 1065 例，而 2016 年仅 88 例[26]，患者来自 40 个州，其中 56% 的患者无国外旅行史[26]。近些年病例数增加的原因未明，尚在调查中。

在流行病区，园艺工人应戴手套防止接触到卡耶塔环孢子虫卵囊。农产品彻底清洗可帮助去除环孢子虫卵囊，但一些水果因易碎而无法彻底清洗，很多加工生鲜原料的生产线不适用加热装置来灭活卡耶塔环孢子虫，而导致疾病传播。此外，加热处理以外的方法如高流体静压处理可灭活弓形虫卵囊，亦可有效灭活环孢子虫。

3. 肉孢子虫属（*Sarcocystis* Species） 人类肠道肉孢子虫可能存在于全球任何地区，这些地区的黄牛、水牛和猪接触人类粪便导致感染流行，在美国尚未检测到该虫的流行。包括摄入生肉或未煮熟的肉制品在内的文化习惯使得肉孢子虫在流行区得以生存，烹饪肉类时内部温度达到 67℃ 以上即可杀死[24]弓形虫和人肉孢子虫的包囊。防止黄牛、水牛和猪接触人粪便，亦可防止肉孢子虫在流行病区的传播。

大多数人类肌肉肉孢子虫感染的报道来自远东地区，尤其是马来西亚（图 144-5）[28-30]。一项来自马来西亚的 100 例尸检病例研究发现，舌组织

切片肉孢子虫的阳性率为 21%[30]，这可能是因为只有少数肌肉可进行组织学检查而致其感染率代表性不足，人可因摄入被孢子囊污染的水[28]或食物而感染。

2009—2010 年间，日本发生了 6 起食物中毒事件，与食用感染法耶里肉孢子虫（*Sarcocystis fayeri*）的生马肉有关[21]。在食入含有法耶里肉孢子虫包囊的肉制品后 1 h 左右即可发生腹泻[31]，从马肉样本中鉴定出一种 15 kDa 的蛋白质毒素，研究表明其与刚地弓形虫和柔嫩艾美球虫（*Eimeria tenella*）的肌动蛋白解聚因子同源，实验发现该毒素可导致食物中毒[32]。

四、临床表现

（一）贝氏囊等孢子虫

贝氏囊等孢子虫有时对免疫功能正常者可造成严重的甚至致命的疾病，其感染症状包括腹泻、脂肪泻、头痛、发热、不适、腹痛、呕吐、脱水和体重减轻[6,12,33]，便血少见，许多患者嗜酸粒细胞会增多。这种疾病通常为慢性且易复发，可在粪便或活检标本中检出贝氏囊等孢子虫，其可存活数月甚至数年，成功治疗和临床症状消失后 10 年还可能复发[34]，婴幼儿及儿童感染后症状更严重。

通常情况下，免疫功能低下患者感染贝氏囊等孢子虫后的临床症状比免疫功能正常患者更为严重。艾滋病患者感染贝氏囊等孢子虫往往引起水样腹泻并可导致脱水，常伴有发热和体重减轻，需要住院治疗。这些患者也可能出现其他机会致病病原体感染。贝氏囊等孢子虫小肠二重感染出现于因嗜酸细胞性胃肠炎而接受全身皮质类固醇激素治疗的免疫抑制患者身上[35]。肾移植[36]和肝移植[37]患者均有贝氏囊等孢子虫感染报道，免疫功能正常患者通常可观察到贝氏囊等孢子虫感染引起的肠损伤和类似化疗的反应。贝氏囊等孢子虫感染者可并发霍奇金病[6]、非霍奇金淋巴瘤[38]、成人 1 型 T 细胞相关性病毒引起的人类 T 细胞白血病[39]、急性淋巴细胞白血病和人类 T 细胞白血病病毒 1 型相关性 T 细胞淋巴瘤[40]，这些患者需要专门治疗贝氏囊等孢子虫。据报道，艾滋病患者可出现肠外包囊样阶段，并且在其感染复发中发挥作用[7]。肠外包囊阶段为单个裂殖子生殖阶段（图 144-4），称为单生组织囊，患者体内可存在成千上万个单生组织囊[7]。个例报告在慢性腹泻的 HIV 患者血液涂片中检出该寄生虫的裂殖子[9]。

研究显示，贝氏囊等孢子虫感染可发生于胆囊[41-43]和子宫内膜上皮细胞中[44]，在胆汁标本中亦可查到卵囊[45]，这些感染者的临床表现是非特异的，往往需进行组织活检后才能确诊。贝氏囊等孢子虫胆道感染首次发现于 HIV 相关的机会感染者中，这可能是艾滋病继发感染[43]。贝氏囊等孢子虫可能产生裂殖子从肠道到达肠外部位，其再从肠外进入组织上皮细胞繁殖。

（二）卡耶塔环孢子虫

非血性水样腹泻是卡耶塔环孢子虫感染的主要临床症状。在一次食源性疾病暴发事件中，50% 以上患者出现恶心、乏力、腹部绞痛和发热等临床症状，其中 30%～45% 患者伴有头痛和呕吐[13]，有些人可能感染但不出现临床症状。大多数免疫功能正常者感染环孢子虫的典型症状包括呈周期性发作的腹泻，伴有厌食、不适、恶心和痉挛及症状缓解期。环孢子虫病的诊断应考虑患者是否存在长期或缓解-复发反复型腹泻，卫生保健部门应该专门进行卡耶塔环孢子虫病检测，包括虫卵和虫体检查或胃肠道病原体检测。检测可能需要几份粪便标本，因为孢子囊壁和卵囊壁会影响卡耶塔环孢子虫 DNA 的提取，而且卵囊可能间歇性地少量排出。阳性病例应向当地卫生部门报告。

免疫抑制患者及免疫功能正常患者感染卡耶塔环孢子虫可能均与其胆道疾病有关[46]。发育期的卡耶塔环孢子虫可见于无结石胆囊炎的艾滋病患者的胆囊上皮细胞中[47]，卵囊则可见于活动性胆道疾病患者的胆汁中。

（三）肉孢子虫肠道感染

肉孢子虫感染有 2 种临床症状，食入被感染的肉制品可引起肠道疾病，食入孢子囊可引起肌肉疾病[48]。肠道疾病主要发生于食入感染的肉制品 3～6 h 后，表现为恶心、腹痛和腹泻等，同时伴有其他肠道病原体感染的患者肠道症状更严重。研究表明，志愿者食用被猪人肉孢子虫感染的猪肉与被人肉孢子虫感染的牛肉相比，前者可引发更严重的疾病[48]。有些人可能会被感染而没有临床症状。

(四)肉孢子虫肌肉感染

人肌肉感染肉孢子虫后通常无症状或仅有轻微临床症状，通常是偶然发现被感染(图 144-5)[49,50]。临床病例报告主要来自东南亚，马来西亚暴发过 3 次急性肉孢子虫肌肉感染[28-29,51]。第一次是在一支美军作战部队的 7 名队员(共 15 名)中暴发，临床症状均与肉孢子虫感染有关[28]。患者从丛林回来后约 3 周出现发热、肌痛、支气管痉挛、一过性瘙痒皮疹、淋巴结肿大及皮下结节症状，以及出现嗜酸粒细胞增多、红细胞沉降率和肌肉肌酸激酶水平升高[28]。第二次[29]和第三次[51]暴发则发生于马来西亚的东海岸，患者为从刁曼岛回来的旅客。第二次暴发于 2011 年夏季，32 例患者大部分来自德国(约 50%)，其余来自欧洲、北美和亚洲国家，回国后几天或几周内，绝大多数患者出现发热和肌肉疼痛[29]，所有患者均出现外周血中嗜酸粒细胞增多，大多数患者血清肌酐磷酸激酶水平升高[29]。第三次暴发于 2011 年和 2012 年的 7～8 月，100 例患者均去过刁曼岛，大多数患者出现发热和肌肉疼痛，少数患者出现关节痛、乏力、头痛、咳嗽和腹泻[51]。

五、标本的采集、运输和储存

合格的样本是实验室诊断获得可靠结果的必要条件，选择合适的样本和固定剂极其重要[52]。新鲜粪便样本应该遵循通用预防措施。如果需将样本送到其他实验室进行检验，需要先进行固定，常用 5%或 10%的福尔马林溶液来固定可疑球虫感染粪便标本。福尔马林固定不会对目前常用于隐孢子虫和十二指肠贾第鞭毛虫的免疫检测方法产生干扰，而聚乙烯醇固定液则可能会有影响。将粪便置于福尔马林固定液中并于 4℃条件下储存，卵囊结构可保持数月不变。

六、直接检测

(一)显微镜检查

新鲜粪便样本直接涂片，当卵囊和孢子囊大量存在时，根据形态特征很容易鉴别贝氏囊等孢子虫卵囊卡耶塔环孢子虫卵囊、肉孢子虫孢子囊(表 144-1，图 144-1)。自发荧光法是观察贝氏囊等孢子虫及卡耶塔环孢子虫卵囊、肉孢子虫卵囊和孢子囊的有效手段(图 144-3)[53-54]，荧光染色显微镜检查已取代了实验室曾经使用过的多种染色方法。

当样本中仅有少量卵囊时，用福尔马林-乙酸乙酯(福尔马林-乙醚少用)沉淀或蔗糖离心浮聚法均有助于虫体富集。对于富集卡耶塔环孢子虫卵囊[55]，蔗糖离心浮聚法优于福尔马林-乙醚沉淀法，该法也可用于贝氏囊等孢子虫卵囊和肉孢子虫孢子囊的富集。但很少有实验室使用蔗糖浓缩技术，因为直接涂片检查很实用，亦可达到经蔗糖离心浮聚后自发荧光法的检测效果[55]，同时，染色过程可能影响到卵囊和孢子囊的自发荧光。

粪便染色涂片常用于检测卡耶塔环孢子虫卵囊，但较少用于贝氏囊等孢子虫卵囊的检测[53,56]。改良 Kinyoun 抗酸染色法常用于贝氏囊等孢子虫和卡耶塔环孢子虫卵囊的检测(图 144-2)，主要缺点是染色不定，且部分卵囊不着色[57]。卵囊通常不采用三色法、铬变素法或革兰-铬变素法染色[57]。吉姆萨染色时部分卡耶塔环孢子虫卵囊呈淡蓝色[57]，番红染色时卵囊呈橙色或粉橙色，加热处理可增强卵囊染色效果。流式细胞术可用于检测人粪便样本中的卡耶塔环孢子虫卵囊[58]。流式细胞术检查结果与显微镜检查结果相似，且前处理时间相当[58]。

单次粪便样本检测阴性并不能排除球虫感染，需在随后几天收集 3 份或更多的粪便样本进行检查才能明确诊断。水样稀便可通过离心浓缩，取沉淀进行涂片染色检查，样本中含有大量卵囊较易诊断，但与临床症状的严重程度无关，有些无症状感染者仍可能会排出卵囊。

从活检标本或尸检标本的肌肉组织中检出肉孢子虫孢子囊可诊断肉孢子虫肌肉感染。冷冻后的肌肉样本可以解冻并固定在 10%的福尔马林溶液中，按常规处理进行苏木素和伊红染色，尽量减少或不破坏肉孢子虫结构。

(二)培养

肠道球虫体外培养常用于研究发育生物学或确定有效的化疗药物，目前尚未用于人感染球虫的诊断。

贝氏囊等孢子虫很难在人回盲肠腺癌细胞HCT-8、肺上皮细胞恶性肿瘤A549、非洲绿猴肾(Vero)或马丹-达比牛肾等哺乳动物细胞中培养出来[59]，尚未有卡耶塔环孢子虫成功培养的报道。应用细胞培养技术将猪人肉孢子虫的缓殖子进行有性生殖，可培养出卵囊细胞[60]。人类肉孢子虫的血管裂殖体阶段尚能在体外培养系统培养，但已有个别哺乳动物和鸟类肉孢子虫的血管裂殖体阶段连续培养成功的报道。培养无性阶段的人肉孢子虫需要提取DNA和抗原进行诊断。

(三)抗原检测

由于无法通过细胞培养获得不同生活史阶段的虫体作为抗原进行诊断，限制了该方法的使用。

(四)核酸检测

一些实验室已经研发了针对目标基因区域*18S rRNA*、*28S rRNA*、*ITS1*、*ITS2*和*cox1*等的核酸检测方法，以证明粪便和组织样本感染了贝氏囊等孢子虫、卡耶塔环孢子虫或肉孢子虫属。目前，许多实验室使用商业化的多重胃肠道试剂盒来检测重要的细菌、病毒及卡耶塔环孢子虫(不包括贝氏囊等孢子虫或肉孢子虫属)等4种原虫病原体的DNA。

基因测序可以用来识别检测到的寄生虫，有时还可以用来确定寄生虫的基因型。

基于内转录间隔区(*ITS*)和*18SrRNA*序列的PCR法检测贝氏囊等孢子虫已有报道[61-62]。采用PCR和MboⅡ核酸内切酶消化的限制性片段长度多态性分析，可以鉴定3种不同基因型的贝氏囊等孢子虫[62]，已检查到同时感染两种不同基因型的患者[62]。扩大范围PCR筛选法(extended-range PCR screening)已用于环孢子虫病的分子诊断，可有效检测粪便和组织学检查环孢子虫阴性患者的样本[63]，该技术也可检测活检标本中发育阶段的虫体[63]。基于*ITS2*序列的实时定量PCR法已被用于粪便样本中贝氏囊等孢子虫的检测[61]。

卡耶塔环孢子虫感染的多次暴发使人们更加注重用分子检测方法来检测粪便、水样及农产品中的卡耶塔环孢子虫的卵囊[64]，*18S rRNA*基因是目前最常用的靶基因。由于卡耶塔环孢子虫与脊椎动物中的艾美球虫十分相近[65]，所以研发能检测水或农产品中的卡耶塔环孢子虫的产品时必须检查其与艾美球虫的交叉反应性[66]。环孢子虫除了可感染人之外的哺乳动物，也存在于水样或农产品中，因此，需要设计特异性的实验来检测环境来源和农产品中的卡耶塔环孢子虫卵囊。

定量PCR法可用于检测粪便样本中的卡耶塔环孢子虫卵囊[67]，这种方法可检测到仅1个卵囊中的*18S rRNA*基因DNA。

通过PCR和PCR产物序列分析可检测人粪便样本和活检肌肉组织中的肉孢子虫卵囊，能对粪便样本和活检肌肉组织中肉孢子虫进行定量检测的PCR方法尚未见报道。

七、血清学试验

血清学试验对诊断贝氏囊等孢子虫、卡耶塔环孢子虫、人肉孢子虫或猪人肉孢子虫帮助不大，因为虫体在肠道发育阶段很少产生抗体。因无法获得足够量的贝氏囊等孢子虫、卡耶塔环孢子虫和肉孢子虫抗原，阻碍了基于抗体的粪便诊断试验的发展。检测肉孢子虫肌肉感染者的抗体可能阳性率会高一些，因为在宿主的血管系统中肉孢子虫囊前裂殖可刺激机体产生抗体[68]。抗体诊断试验通常可用于检测马中枢神经系统的肉孢子虫感染，以研究肉孢子虫感染在多种中间宿主之间的流行病学。

八、治疗

(一)贝氏囊等孢子虫

复方磺胺甲噁唑是贝氏囊等孢子虫的首选治疗药物。甲氧苄啶(160 mg)-磺胺甲噁唑(800 mg)2～4次/天，连续服用10～14天以清除虫体。治疗后，平均2.5天内即可减轻腹泻和腹痛症状[69]。在抗逆转录病毒联合疗法(cART)出现之前，此疗法被推荐用于HIV-1感染和CD4$^+$细胞<200的患者的二级预防，服用甲氧苄啶(320 mg)-磺胺甲噁唑(1600 mg)1次/天或3次/周以防止复发。大多数情况下，CD4$^+$细胞>200时该疗法不用于二级预防。然而，最近的一项研究报道了8例贝氏囊等孢子虫慢性感染案列，接受标准的复方磺胺甲噁唑治疗和二级预防，对cART具有良好的免

疫学和病毒学反应[70]，其中4例患者死亡，2例仍有临床症状，2例康复[71]。

对磺胺过敏或不耐受的患者没有标准的治疗方法，可以使用乙胺嘧啶50～75 mg/d作为替代疗法[72]，对于未使用cART治疗的患者乙胺嘧啶25 mg/d可作为二级预防用药[72]。乙胺嘧啶应与叶酸(5～10 mg/d)配合使用，以减少骨髓抑制。另一种替代药物是环丙沙星(一种可抑制拓扑异构酶的氟喹诺酮)，在22例囊等孢子虫病和HIV感染的随机病例研究中，接受复方磺胺甲噁唑治疗的10例患者，2天内腹泻停止；另外12例患者接受了环丙沙星(500 mg，每天2次)治疗，其中10例在4.5天内腹泻停止[73]。粪便中持续发现贝氏囊等孢子虫卵囊的3例患者(2例腹泻和1例未腹泻)，复方磺胺甲噁唑治疗效果明显[73]。环丙沙星治疗有效的患者，持续使用环丙沙星治疗可防止复发[73]。硝唑尼特已经用于治疗贝氏囊等孢子虫感染[74-75]，2例患者给予硝唑尼特500 mg，2次/天，连续3天治疗后，卵囊检测为阴性[75]；1例患者给予硝唑尼特500 mg，2次/天，连续7天，治疗后14天，卵囊检测为阴性[74]。同时也观察到1例治疗失败的案例：胆道囊等孢子虫感染，吸收障碍，口服硝唑尼特2 g，2次/天[76]，极有可能是由于硝唑尼特吸收水平差而导致血药浓度过低[76]。肝功能异常和恶心是口服硝唑尼特潜在的不良反应。

在对8例患有贝氏囊等孢子虫肠炎的艾滋病患者的治疗研究中，给予地克珠利200 mg/d治疗，连续7天，其中4例腹泻症状消失[70]。有报道给予地克珠利300 mg，2次/天，成功治疗患有贝氏囊等孢子虫肠炎且磺胺和乙胺嘧啶过敏的艾滋病患者，在此病例中，当剂量降低至300 mg/d时腹泻复发[77]。甲硝唑、替硝唑、奎纳克林和呋喃唑酮等可用于其他原虫治疗的药物对治疗贝氏囊等孢子虫感染基本无效。

(二)卡耶塔环孢子虫

治疗卡耶塔环孢子虫感染的首选药物是甲氧苄啶(160 mg)-磺胺甲噁唑(800 mg)，2次/天，连服7天[78-79]。治疗后平均2.5天以内虫体清除、腹泻减少和腹痛减轻，cART治疗的患者可能不需要二级预防治疗。

对于磺胺过敏或不耐受的患者，目前没有标准的治疗方法。有评估研究发现硝唑尼特对卡耶塔环孢子虫疗效显著，有效率约为70%[80-81]。然而，只有少数患有卡耶塔环孢子虫病的患者参与了研究[80-81]。另一种替代药物是环丙沙星，随机研究了20例卡耶塔环孢子虫病患者，发现其中9例在接受复方磺胺甲噁唑治疗后3天之内腹泻停止；其余11例患者中的10例在接受环丙沙星500 mg，2次/天后，4天内腹泻停止；但只有7例患者经环丙沙星治疗后，粪便中虫体被清除[73]。零星的数据表明，下列药物无效：阿苯达唑、阿奇霉素、乙胺嘧啶、萘啶酸、诺氟沙星、替硝唑、甲硝唑、奎纳克林、四环素、多西环素和糠酸二氯尼特(L. M. Weiss等，未公布资料)。

(三)人肉孢子虫、猪人肉孢子虫及肌肉肉孢子虫

目前，没有已知方法用于治疗或预防人肉孢子虫引起的肠道感染、肌炎、血管炎或其他相关病变。去马来西亚[28-29]旅游应采取预防措施，不要饮用或食用可能被孢子囊潜在污染的水或食物，对感染发热重症腹泻患者应采取有效的支持治疗。

有个例报道阿苯达唑对肉孢子虫引起的嗜酸性肌炎有效[28]。对肉孢子虫引起的肌炎和血管炎，类固醇可能通过抑制炎症反应起作用，但从未在对照试验中评估过。

(四)治疗失败

目前，没有发现贝氏囊等孢子虫、卡耶塔环孢子虫或肉孢子虫耐药菌株。在一项对8例患有贝氏囊等孢子虫的艾滋病患者的研究中发现，复方磺胺噁唑具有抗药性，但不能排除其他因素的影响，如抗原特异性免疫缺陷或肠道免疫全面下降等[71]，目前看来，治疗失败最有可能是药物的吸收或分布不良，而不是真的出现了耐药性。

九、结果的评价、解释和报告

贝氏囊等孢子虫和卡耶塔环孢子虫感染通常通过粪便检查卵囊以诊断，很少漏诊，不需要对每高倍视野中虫体数量进行定量。粪便检测报告为阴性时应注明至少需要进行3份粪便样本检查，可检测到95%的感染者，如果仅对单个样本检测，则可能有30%的感染者漏诊。如果抗酸染色或类

似染色的样本检查结果是阳性的，应该在报告中标注。计算机报告注明复方磺胺甲噁唑为这些寄生虫首选药物。PCR 法可用于鉴定这些微生物，但贝氏囊等孢子虫和肉孢子虫没有商品化试剂，应标识为实验测试。目前，血清学试验不能用于这些疾病的诊断。只有卡耶塔环孢子虫感染需报告国家卫生部门和疾病预防控制中心，因为它与疾病暴发和食物污染有关。

人肉孢子虫和猪人肉孢子虫可通过其在粪便样本或组织活检标本中特有的形态进行鉴定，观察孢子囊结构仅能鉴定到属，不能鉴定到种。由于这些感染少见，应由寄生虫专家确认所观察到的虫体，检验报告应表明这些寄生虫是否经过专家确认。

参考文献请扫二维码查阅

第145章　隐孢子虫

LIHUA XIAO，VITALIANO CAMA

（贾伟　译；陈家旭　审校）

隐孢子虫（*Cryptosporidium* spp.）寄生于脊椎动物胃肠道和呼吸道上皮细胞的刷状缘，感染人体后可引起小肠结肠炎、腹泻和胆管病变[1]。免疫功能正常儿童和成人患隐孢子虫病，通常病程较短，伴有水样泻、恶心、呕吐和体重减轻；而免疫功能低下者患隐孢子虫病时，则迁延不愈甚至危及生命。在发展中国家，隐孢子虫病是导致中重度腹泻和腹泻相关死亡的最重要原因之一[2-4]。在发达国家，隐孢子虫是一种公认的水源性和食源性病原体，曾多次引起人群隐孢子虫病的暴发[5-6]。

一、分类

隐孢子虫属于囊泡虫总门（Alveolata），顶复门（Apicomplexa），类锥体纲（*Conoidasida*）。在系统学上，与包含环孢子虫（*Cyclospora*）、囊等孢子虫（*Cystoisospora*）、肉孢子虫（*Sarcocystis*）和弓形虫（*Toxoplasma*）的球虫（*coccidia*）相比，隐孢子虫更接近簇虫（*gregarinasina*）亚纲[7]。

近年来，根据不同动物感染隐孢子虫的大量生物学特征和分子遗传学研究结果，对隐孢子虫进行了重新分类[8]。现有超过30种已知的隐孢子虫，脊椎动物中常见的包括感染人的人隐孢子虫（*Cryptosporidium hominis*）和旅行者隐孢子虫（*C. viatorum*）；感染人和断奶前反刍动物的微小隐孢子虫（*C. parvum*），感染断奶犊牛和成年牛的安氏隐孢子虫（*C. andersoni*）、牛隐孢子虫（*C. bovis*）和瑞氏隐孢子虫（*C. ryanae*），感染绵羊和山羊的泛在隐孢子虫（*C. ubiquitum*）和肖氏隐孢子虫（*C. xiaoi*），感染猪的猪隐孢子虫（*C. suis*）和种母猪隐孢子虫（*C. scrofarum*），感染犬的犬隐孢子虫（*C. canis*），感染猫的猫隐孢子虫（*C. felis*），感染兔的兔隐孢子虫（*C. cuniculus*），感染豚鼠的维瑞隐孢子虫（*C. wrairi*）和霍迈隐孢子虫（*C. homai*），感染啮齿类动物的鼠隐孢子虫（*C. muris*）、泰泽隐孢子虫（*C. tyzzeri*）和增殖隐孢子虫（*C. proliferans*），感染有袋动物的费氏隐孢子虫（*C. fayeri*）和袋鼠隐孢子虫（*C. macropodum*），感染鸟类的火鸡隐孢子虫（*C. meleagridis*）、贝氏隐孢子虫（*C. baileyi*）、鸡隐孢子虫（*C. galli*）和禽隐孢子虫（*C. avium*），感染爬行类动物的蜥蜴隐孢子虫（*C. varanii*）和蛇隐孢子虫（*C. serpentis*），感染两栖类动物的脆弱隐孢子虫（*C. fragile*）及感染鱼类的摩氏隐孢子虫（*C. molnari*）和菱鲆隐孢子虫（*C. scophthalmi*）。还有很多种宿主特异性的基因型尚未命名，如隐孢子虫马基因型、臭鼬基因型，花栗鼠基因型Ⅰ、Ⅱ及鹿鼠基因型Ⅰ-Ⅲ[8]。根据生物学、形态学和系统发育学，将隐孢子虫虫种和基因型分为3个群：肠、胃和鱼[9]。只有部分虫种和基因型（几乎全部来自于哺乳动物，可以在人类身上发现[10]。

二、病原描述

隐孢子虫是细胞内的原虫，主要感染肠道和胆管的上皮细胞，尤其是回肠和结肠。严重免疫抑制者，可感染整个胃肠道，有时累及呼吸道。尽管尚不清楚呼吸系统在隐孢子虫病传播中的作用，但免疫正常者呼吸系统的参与可能比以前认为的更为普遍[11]。虽然感染部位因虫种而异，但是隐孢子虫的几乎整个发育过程都发生在上皮细胞膜的2个脂蛋白层之间。

人或其他易感宿主摄入隐孢子虫卵囊而感

染，与环孢子虫和囊等孢子虫不同，隐孢子虫的卵囊在排出后孢子化（图145-1）。遇到胃和十二指肠液时卵囊脱囊释放出4个孢子，侵入上皮细胞，在纳虫泡内发育为滋养体，并经历2～3代无性繁殖和1代有性生殖，形成新的卵囊。卵囊在原位孢子化后随粪便排出体外，被新的宿主摄入后，无须进一步发育即可引起感染（图145-1）。从吞入感染性卵囊到完全发育为新卵囊随粪便排出的时间，因感染的虫种、宿主和虫量不同而各异，一般需要4～10天。除了经典的球虫发育阶段外，还有簇虫样的细胞外发育阶段，即2个或2个以上的虫体通过尾对尾的融合进行有性生殖[7]。

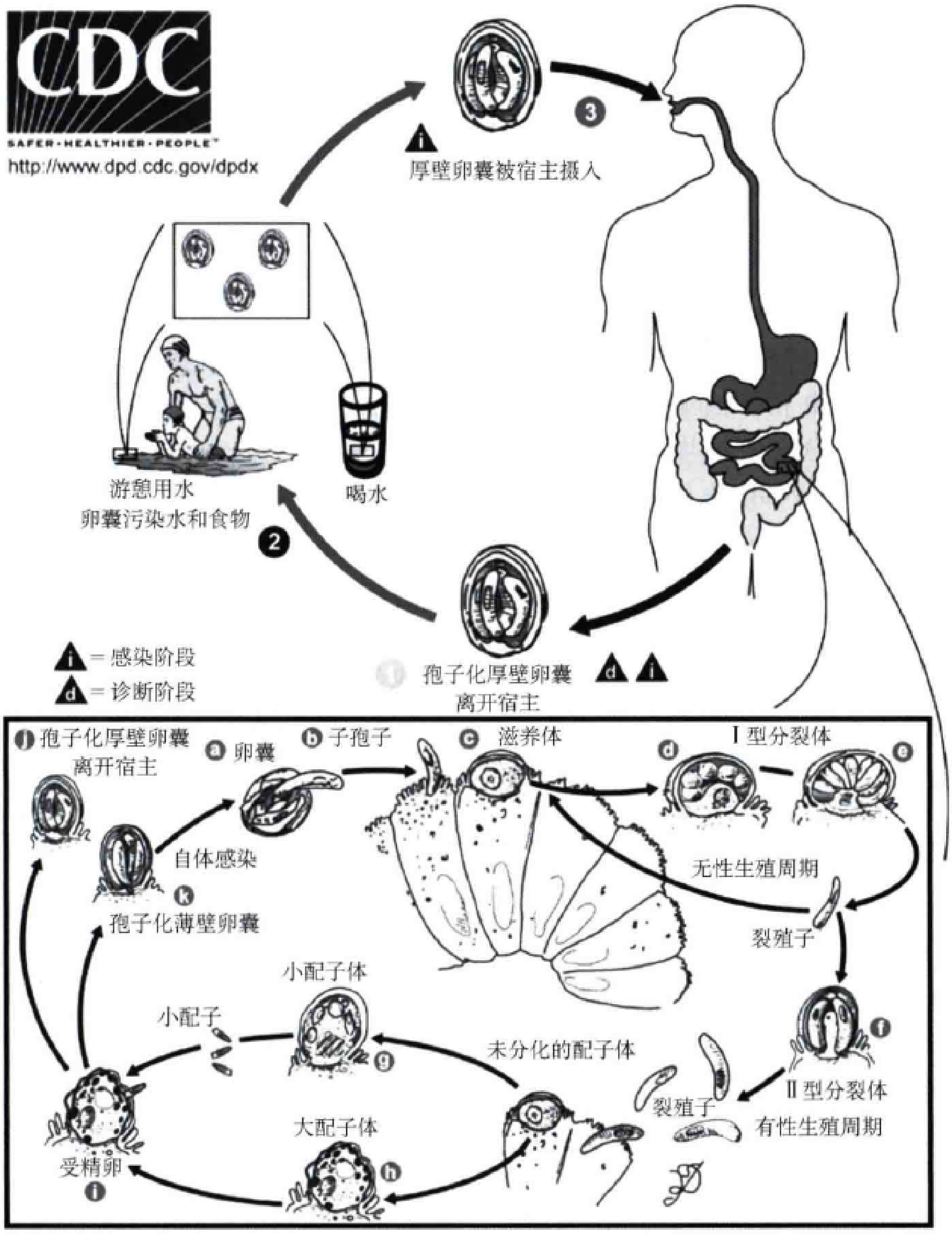


图145-1 隐孢子虫生活史：①孢子化卵囊（含4个子孢子），随感染宿主粪便和其他途径（如呼吸道分泌物）排出体外。②人群隐孢子虫的传播主要通过接触隐孢子虫感染者（感染人隐孢子虫和微小隐孢子虫）或感染的动物（大多数为微小隐孢子虫），以及摄入被隐孢子虫卵囊污染的水和食物而传播。③被适宜宿主摄入（或吸入）；脱囊（a）；子孢子被释放并寄生于胃肠道上皮细胞（b、c）或其他组织如呼吸道，在上皮细胞中，卵囊进行无性生殖（裂体生殖或卵块发育）（d～f），然后进行有性生殖（配子生殖），形成小配子体（雄性）（g）和大配子体（雌性）（h）。随后大小配子体受精（i），卵囊在感染宿主体内发育成孢子（j、k）。形成2种不同的卵囊，厚壁卵囊通常由宿主排出体外（j）；薄壁卵囊主要参与自体感染（k）。排出体外的感染性卵囊可直接经粪-口途径传播（由DPDx：http://www.cdc.gov/dpdx/提供），见彩插

目前，约有20种隐孢子虫虫种和基因型可感染人，包括人隐孢子虫、微小隐孢子虫、火鸡隐孢子虫、猫隐孢子虫、犬隐孢子虫、兔隐孢子虫、泛在隐孢子虫、旅行者隐孢子虫、鼠隐孢子虫、猪隐孢子虫、种母猪隐孢子虫、费氏隐孢子虫、安氏隐孢子虫、牛隐孢子虫、肖氏隐孢子虫、泰泽隐孢子虫、艾氏隐孢子虫，以及隐孢子虫马基因型、臭鼬基因型、刺猬基因型和花栗鼠Ⅰ基因型[12]。人主要感染人隐孢子虫和微小隐孢子虫。人隐孢子虫可感染几乎所有人和非人类灵长类，被认为是人源性隐孢子虫。而微小隐孢子虫主要感染人和反刍动物，被认为是动物源性隐孢子虫。其他隐孢子虫，如火鸡隐孢子虫、猫隐孢子虫、犬隐孢子虫、兔隐孢子虫、泛在隐孢子虫、旅行者隐孢子虫和鼠隐孢子虫及花栗鼠Ⅰ基因型人体感染则较少见。其余隐孢子虫和基因型仅有几例人体感染病例[10,13]。这些隐孢子虫均可感染免疫功能正常和免疫功能低下人群，人感染隐孢子虫随地域和社会经济条件而不同，火鸡隐孢子虫、犬隐孢子虫、猫隐孢子虫和旅行者隐孢子虫常见于发展中国家，泛在隐孢子虫和花栗鼠Ⅰ基因型隐孢子虫常见于发达国家，兔隐孢子虫则大多发生在英国[10,12,14-15]。这可能与传染源和传播途径不同有关。

三、流行病学、传播和预防

隐孢子虫呈全球分布，环境中卵囊无处不在。从2004年起，美国每年感染隐孢子虫病的患者数基增加了2倍以上；1999－2002年，年报告病例从2769例增至3787例；2003－2005年，从3505例增至8269例；2006－2008年，从6479例增至11 657例；2009－2010年，从7656例增至8951例；2011－2012年，从8008例增至9313例[16-20]。目前，美国每年隐孢子虫病患者数约75万人，其中98.6%的病例未确诊或未上报[6]。据估计，在美国每年因隐孢子虫病住院的费用达4500万美元，病例人均花费16 797美元[21]。在发展中国家，隐孢子虫病是导致中度至重度腹泻及幼儿腹泻相关死亡的最重要原因之一[2-4]。人可通过多种途径感染隐孢子虫病，如直接接触被感染的人或动物及摄入被污染的水（饮用水或娱乐场所的水）或食物[10,15,22]。然而，每种途径在人体隐孢子虫感染传播中的作用尚不清楚。为了应对这种情况及国内近年来不断增多的隐孢子虫病报道，美国疾病预防控制中心（CDC）于2010年推出了第一个用于寄生虫感染的分子追踪系统——CryptoNet（https://www.cdc.gov/parasites/crypto/cryptonet.html）[23]，旨在有效利用现有基础设施，以促进隐孢子虫流行病学数据及分子特征的系统收集和实时共享。这有助于更好地了解隐孢子虫的传播情况，并研究隐孢子虫病的爆发。

（一）易感人群

在发展中国家，隐孢子虫主要感染2岁以下儿童，且为该年龄段引起腹泻的五大病因之一[2-3,14]。对临床隐孢子虫病没有明显的种特异性保护，随着年龄的增长和反复接触，针对隐孢子虫病的免疫力会逐渐增强[24]。在发达国家，发病儿童的年龄大于发展中国家，可能是由于卫生条件较好使暴露于污染环境的年龄延迟[15,25]。

隐孢子虫病还常见于养老院的老年人中，那里人与人之间的传播可能对隐孢子虫感染的传播起主要作用[25-26]。在美国和英国，普通人群中，多数成年人对隐孢子虫易感，零星感染可发生于各个年龄段，前往发展中国家旅游，摄入被卵囊污染的食物和水常可导致隐孢子虫感染[23,27-30]。隐孢子虫病常见于免疫功能缺陷人群，包括艾滋病患者、原发性免疫功能缺陷者、接受免疫抑制治疗的癌症患者和器官移植患者[31-38]。慢性肾衰竭和肾移植术后接受血液透析的患者易发展为隐孢子虫病[32,38-43]。在HIV阳性人群中，当$CD4^+$淋巴细胞数下降，尤其低至200细胞/μl时，隐孢子虫病的发病率增高[44-46]。

（二）人源-动物源传播

在发达国家，与腹泻患者接触被认为是散发性隐孢子虫病的主要危险因素[28,30,47-49]。在这些国家中，日托所、养老院和母婴间的高患病率支持了这点。欧美国家的研究表明，男同性恋者比其他HIV患者更易感染隐孢子虫病[50]，表明人与人之间或人源传播隐孢子虫病是非常普遍的。

仅有少量病例对照研究评估了动物源性传播在人类隐孢子虫感染中的作用。在发达国家，与农场动物的接触（尤其是牛）是人类隐孢子虫病散发病例的高危因素[23,28,47-48,51-52]。同样，在中国、

埃塞俄比亚和尼日利亚，与农场动物接触被认为是艾滋病患者和免疫能力正常的人感染隐孢子虫的危险因素[45, 53-55]。宠物在人类隐孢子虫感染的传播中的作用可能不太重要[56-57]。然而，已有猫、狗将猫孢子虫和犬孢子虫直接传播给人的报道[58-59]。

人感染微小隐孢子虫和人隐孢子虫在人体中的分布反映出不同的传播途径。迄今，在发展中国家进行的研究表明，儿童或 HIV 阳性的成年人，主要感染人隐孢子虫。在美国、加拿大、澳大利亚和日本大部分地区也同样如此。然而，在欧洲和新西兰，多项研究表明在免疫功能正常和免疫功能低下人群中，微小隐孢子虫和人隐孢子虫感染率几乎相同[10, 14-15]。然而，中东的儿童大多感染微小隐孢子虫[60-62]。人感染不同隐孢子虫基因型可能是感染源不同所致[8, 10, 12, 63]。例如人隐孢子虫最有可能是因为人与人之间的传播，而微小隐孢子虫则既有人与人之间的传播，也有人与动物的传播。因此，在大多数发展中国家，人与人之间传播可能是人感染隐孢子虫病的主要原因，而在欧洲、新西兰和美国的农村地区，无论是人与人之间传播还是人畜之间的传播都至关重要。

近期，基于糖蛋白(gp60)基因序列分析研究表明，人感染微小隐孢子虫并非是动物源性传播[10]。在已鉴定的几个隐孢子虫亚型中，Ⅱa 和Ⅱc 是最常见的 2 个亚型。前者可见于人和反刍动物，被认为是人畜共患病病原体；而后者仅感染人[9-10]，因此被是人患病病原体。在发展中国家，儿童和 HIV 阳性患者感染的微小隐孢子虫大多数是Ⅱc 亚型，基本上没有Ⅱa，表明在这些地区，微小隐孢子虫在人与人之间传播普遍[9-10, 14]；相反，发达国家患者感染微小隐孢子虫Ⅱa 和Ⅱc 2 种亚型都有，前者远较后者普遍。即使是在英国这种人畜传播在人隐孢子虫病传播中起重要作用的国家，也会发生微小隐孢子虫在人与人之间传播[64]。另一个微小隐孢子虫亚型Ⅱd 常见于绵羊和山羊，中东国家人感染微小隐孢子虫多见此亚型[60]。多位点亚型分析支持 gp60 的亚型研究结果[65-66]。

(三)水源性传播

流行病学研究表明，水源传播是隐孢子虫病在发达国家的主要传播途径[67]。在美国和欧洲，人隐孢子虫感染率的季节性变化部分归因于水传播[23, 25, 27-28, 68]。在美国，隐孢子虫病的散发病例夏季达高峰[19-20, 23, 25, 28]，主要是因为如游泳和水上运动等水上娱乐活动的增加[69]。在发展中国家，水在隐孢子虫感染中的作用尚不清楚。在大多数热带国家，儿童的隐孢子虫感染在雨季达到高峰，这表明水传播可能在这些地区的隐孢子虫病传播中发挥潜在作用[14]。但是，在印度南部一个贫民窟进行的一项研究中，瓶装水并不会降低儿童隐孢子虫病的发生率[70]。

在美国、加拿大、英国、法国、澳大利亚、日本和其他发达国家发生过水源性隐孢子虫病暴发[5, 71-75]，这些暴发与饮用水和娱乐用水(游泳池和水上乐园)有关。自 1993 年威斯康辛州密尔沃基暴发大规模的隐孢子虫病后，水厂均采取了更严格的水源处理方法。当前，在美国和英国，与饮用水有关的暴发数量正在减少，在美国，大多数暴发与娱乐用水相关[23,25,69,74]。虽然常见感染人体的隐孢子虫有 5 种，但微小隐孢子虫和人隐孢子虫为大多数隐孢子虫病暴发的主要病原；其中人隐孢子虫感染的疫情多于微小隐孢子虫[10]。英国与此情况相同，普通人群常感染微小隐孢子虫和人隐孢子虫。最近，有一起因饮水导致兔隐孢子虫感染的暴发案例[76]。日本一所高中校舍发生由火鸡隐孢子虫感染的暴发，尽管水源性传播在这次暴发中的作用尚不明确[77]。

(四)食源性传播

食源性传播也是隐孢子虫病流行的重要途径，隐孢子虫卵囊可从水果、蔬菜和贝类中分离到[78-82]。在发达国家，隐孢子虫病的暴发与动物或食品加工者的粪便直接污染食物有关。大多数情况下，人感染通常是摄入被卵囊污染的新鲜果蔬和未经高温处理的苹果汁或牛奶等[83-88]。

极少数的病例对照研究表明，隐孢子虫病流行区被污染的食物是隐孢子虫感染的危险因素。巴西一项针对儿童的研究未能显示出隐孢子虫感染与饮食或食物卫生之间的任何关联[89]，尽管肯尼亚内罗毕城市达戈雷蒂的奶牛场参与人畜共患隐孢子虫感染的风险评估表明，食用被奶牛污染的蔬菜存在潜在危险[90]。美国、英国和澳大利亚的病例对照研究表明，免疫功能正常者食用生的蔬菜，隐孢子虫感染率较低，可能是由于持续接触隐

孢子虫污染的新鲜果蔬而获得免疫性[28,47,49,91]。据估计,美国约8%的隐孢子虫感染是由食源性传播引起[6]。

(五)预防

因隐孢子虫为粪-口途径传播,故良好的卫生习惯是预防隐孢子虫感染的关键[22,92-93]。特别是免疫功能抑制人群更应采取必要的防护措施预防隐孢子虫病[94],包括饭前便后、换尿布及与宠物或泥土(包括花园泥土)接触后洗手;避免饮用湖水、河水、娱乐场所的水、未经高温灭菌的牛奶、乳制品和果汁,遵循安全性行为。隐孢子虫病暴发期间,社区发布建议饮用开水的公告,居民应将水煮沸1 min以杀死隐孢子虫,或使用直径小于1 μm的过滤器进行自来水过滤。免疫功能低下人群,去疫区旅行时,也应注意避免食用生的贝类、蔬菜沙拉及未削皮的水果[94]。

四、临床表现

在发展中国家,儿童感染隐孢子虫病,常表现为腹泻、腹部绞痛、恶心、呕吐、头痛、乏力和低热[14],腹泻为大量水样便,不予治疗,1～2周亦可止泻。并非所有儿童感染隐孢子虫均有腹泻或胃肠道症状,一项基于社区的研究显示,儿童感染隐孢子虫引起的腹泻发生率<30%[24,95]。即使是亚临床症状和无临床症状的儿童患者,其生长发育也会产生严重影响,表现为生长缓慢,体重和身高均发育迟缓[14,31]。儿童可反复感染,这表明儿童抗隐孢子虫感染的免疫力是短暂或不完全的[24,96]。在发展中国家,隐孢子虫病与死亡率增加相关[2,97],在全球范围内隐孢子虫病是2015年5岁以下儿童与腹泻相关死亡的第二大重要原因[4]。

与发展中国家不同的是,在发达国家,包括儿童和成人在内,具有免疫力的散发性隐孢子虫病患者更容易腹泻[15,31]。在感染最严重时,每天大便7.0～9.5次[91],其他症状包括腹痛、恶心、呕吐和低热,病程平均9～21天,平均为5个工作日,并且7%～22%为住院病例[27,29,91]。感染人隐孢子虫的患者比感染微小隐孢子虫的患者更易出现关节痛、眼痛、反复头痛、眩晕和乏力[98]。不同隐孢子虫种和不同人隐孢子虫亚型引起的儿童隐孢子虫病临床表现存在显著差异[96]。

隐孢子虫病对于免疫功能低下人群,包括艾滋病患者,经常伴有慢性腹泻,可危及生命[44]。艾滋病患者和其他免疫功能缺陷患者患隐孢子虫病也常见硬化性胆管炎和其他胆道疾病[35,99-100]。重度免疫功能低下者,常出现呼吸系统疾病[101]。艾滋病患者患上隐孢子虫病可致死亡率增高,生存期缩短[102]。在发展中国家,HIV阳性者感染不同的隐孢子虫和不同的人隐孢子虫亚型,临床表现也不同[103]。

五、标本的采集、运输和储存

目前,粪检是诊断隐孢子虫感染最有效的方法。粪便标本通常为采集的新鲜标本或10%福尔马林溶液和聚乙烯醇(PVA)固定的标本[104]。然而,经福尔马林和含汞防腐剂处理的粪便标本不能用于分子诊断[105]。PCR法常可用于隐孢子虫暴发调查时,对阳性标本进行基因分型和亚型分析,新鲜、冻存,保存在Cary-Blair运输基质液或储存在乙醇固定剂、锌处理的聚乙烯醇或2.5%重铬酸钾中的标本,均可用于核酸检测。如果怀疑有隐孢子虫感染,而显微镜检、免疫分析或PCR检测呈阴性,建议尽可能对每位患者检查多个样本(取3个样本,每次间隔2～3天)[104]。有时可对肠道或胆道活检标本及痰或支气管肺泡灌洗液进行检查,以诊断艾滋病患者的隐孢子虫病[104,106]。

六、直接检测

临床实验室对粪便样本用显微镜检查卵囊、免疫学检测抗原和PCR检测核酸来检测标本[107]。

(一)显微镜检查

如果粪便标本中卵囊数量较多,可以通过显微镜直接观察湿或染色粪便标本直接检查隐孢子虫卵囊。人隐孢子虫卵囊通常为4～6 μm。鼠隐孢子虫卵囊也可检出,与人隐孢子虫卵囊相比稍大,为6～8 μm,需要在诊断时对大量卵囊进行精确测量。卵囊可用乙酸乙酯沉降法或氯化钠或蔗糖浮选法浓缩[104]。浓缩后的粪便标本

可用多种方法镜检。隐孢子虫卵囊可通过亮视野显微镜检测到。这使得观察卵囊的形态和更精确的测量卵囊成为可能，这在生物学研究中是经常需要的。微分干涉对比显微镜可用于显微技术，从而获得更好的卵囊内部结构的图像和显示。由于隐孢子虫卵囊体积小，显微镜检查敏感性不高。

粪便样本浓缩后进行涂片染色镜检，更易检出隐孢子虫卵囊。许多特殊染色被用于隐孢子虫卵囊的检测[104]，最为常用的是改良抗酸染色和金胺酚染色[107]，特别是在发展中国家。因为这 2 种方法成本低、简便易行、无需特殊显微镜，并可检测其他病原体，如囊等孢子虫（*Cystoisospora*）［以前的等孢子虫（*Isospora*）］和环孢子虫（*Cyclospora*）（图 145-2）。改良萋-尼抗酸染色和改良 Kinyoun 抗酸染色法被广泛使用，在蓝色或绿色的背景下，卵囊被染成亮红色至紫色之间（图 145-2）。

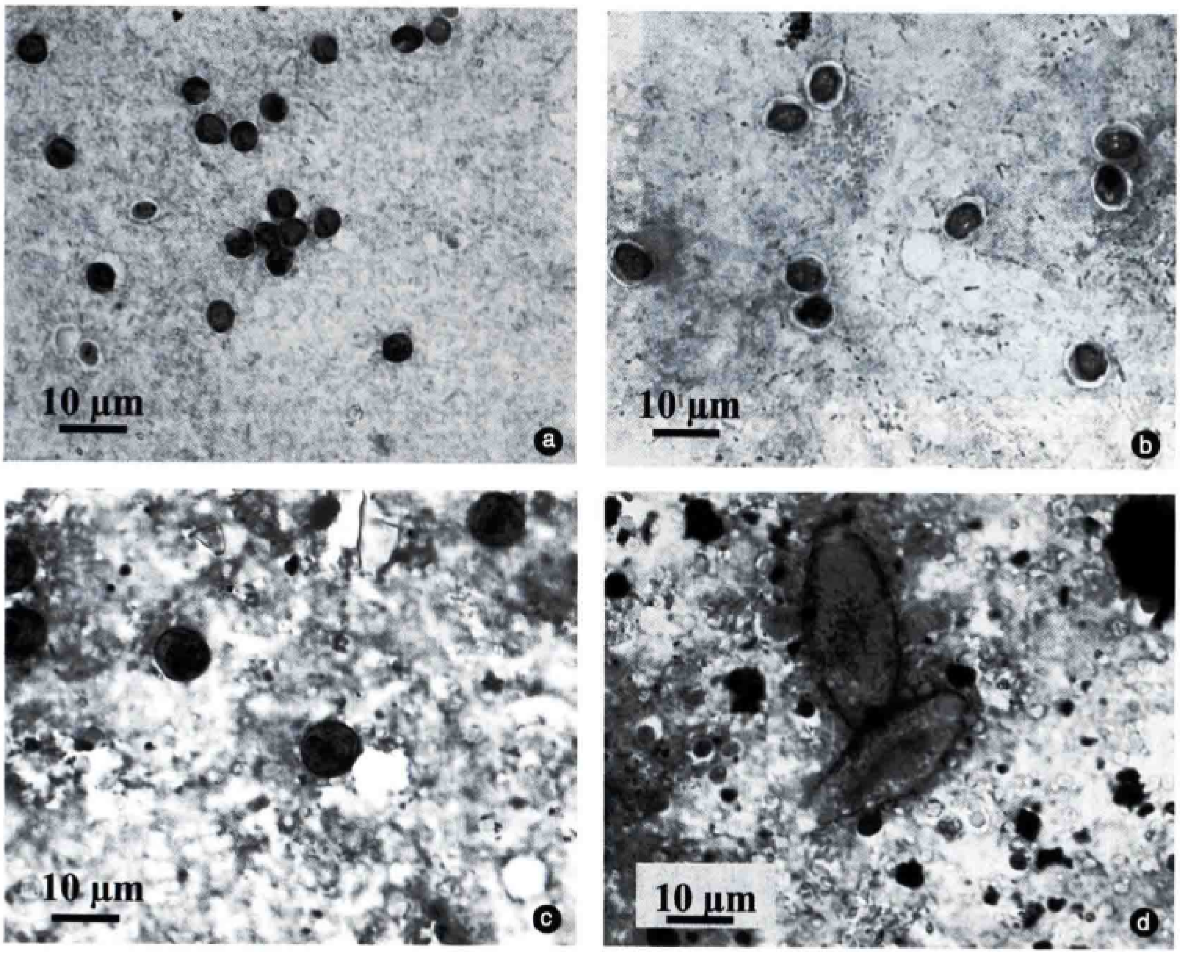


图 145-2 改良萋-尼抗酸染色法：人隐孢子虫卵囊（4～6 μm）(a)，鼠隐孢子虫卵囊（6～8 μm）(b)，环孢子虫卵囊（8～10 μm）(c)和贝氏等孢球虫（20～30 μm）×（10～20 μm）(d)，见彩插

直接荧光抗体试验（direct fluorescent-antibody assays，DFA）已越来越多地用于隐孢子虫卵囊镜检，尤其是在发达国家。与抗酸染色法相比，DFA 具有更高的敏感性和特异性[104]。许多商业化 DFA 试剂盒可用于隐孢子虫诊断，且大部分试剂盒可同时检测贾第鞭毛虫（Giardia）包囊（表 145-1）。在免疫荧光显微镜下，隐孢子虫卵囊在黑色背景下呈现苹果绿色（图 145-3），已有研究表明，商业 DFA 试剂盒中的大多数抗体可与几乎所有隐孢子虫物种的卵囊发生反应，从而确保了检测隐孢子虫物种的广度[108]。

与 DFA 相比，大多数镜检敏感性较低。乙酸乙酯浓缩法联合 DFA 的检测阈值为 10 000 个卵囊/g 稀便，50 000 个卵囊/g 成形便[109-110]，与犬粪便样本检测敏感性相似[111]。DFA 的敏感性是改良抗酸染色法的 10 倍[110]，可能是由于改良抗酸染色法并不能着染所有的卵囊[112]。如检测中加入免疫磁珠技术分离卵囊，DFA 法检测敏感性则可显著提高[104]。

表 145-1 检测隐孢子虫卵囊的商业化免疫荧光检测试剂

产品	生产商或经销商	认证[a]
Merifluor 隐孢子虫/贾第鞭毛虫	Meridian Biosciences，美国(http://www.meridianbioscience.com)	FDA/CE
隐孢子虫	Cellabs，澳大利亚(http://www.cellabs.com.au)	CE
隐孢子虫/贾第鞭毛虫 DFA	IVD Research Inc.，美国(http://www.ivdresearch.com)	FDA

注：[a] FDA. 美国食品和药品监督管理局；CE. 欧洲统一(医疗器械符合欧盟标准，可在这些国家合法销售)

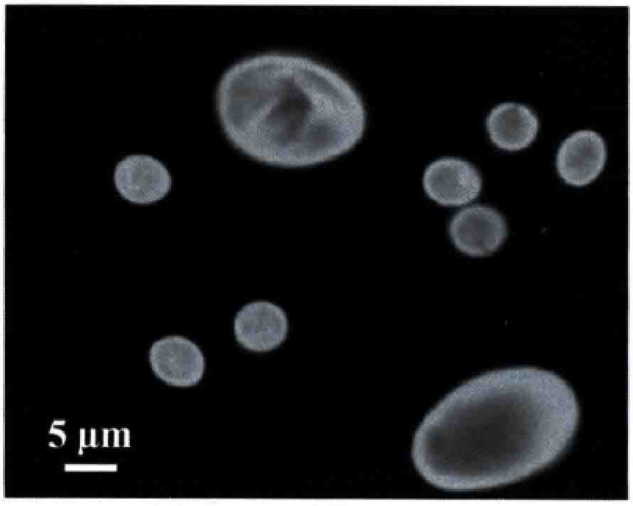


图 145-3 免疫荧光显微镜下人隐孢子虫卵囊(4～6 μm)和贾第鞭毛虫卵囊[(11～14) μm×(7～10) μm]，见彩插

(二)抗原检测

应用免疫法检测粪便样本中隐孢子虫抗原也可诊断隐孢子虫感染[107]。自 1990 年以来，基于抗原捕获的酶免疫测定法用于隐孢子虫病的诊断。近年来，因无需经验丰富的显微镜操作者，同时可用于大样本筛选[107]，酶免疫测定法开始普及。在临床实验室，一些商业化的酶免疫检测试剂盒(表 145-2)被广泛使用。这些试剂盒特异性高(99%～100%)[113]，然而，据报道敏感性可从 70%[114] 到 94%，再到 100%[113, 115]。大多数酶免疫检测试剂盒仅是用感染人隐孢子虫或微小隐孢子虫的患者粪便来评估的[113]。应该评估其在检测人类致病隐孢子虫中的性能，这些隐孢子虫明显不同于人隐孢子虫和微小隐孢子虫，例如犬隐孢子虫和猫隐孢子虫[113]。商业化的 EIA 试剂盒检测动物隐孢子虫的有效性受到抗体特异性的影响。

近年来，一些快速检测粪便中隐孢子虫的商业化免疫层析检测技术已经上市(表 145-3)。在评价研究中，这些检测技术显示了高特异性(>90%)和敏感性(98%～100%)[116-119]。然而，在一些研究中显示的敏感性只有 68%～75%[114, 120-122]。美国已报道有一些快速检测技术在临床诊断中假阳性率高(阳性预测值为 56%)[123-124]。这促使州与地方流行病学家委员会决定将快速免疫检测阳性的确诊病例改为疑似病例。近期又有报道显示，一些快速检测试剂盒在检测其他隐孢子虫时，敏感性(<35%)低于人隐孢子虫和微小隐孢子虫[122]。

表 145-2 用于检测粪便样本中隐孢子虫抗原的商业化酶免疫法试剂[a]

产品	生产商或经销商	认证[b]
隐孢子虫Ⅱ，贾第鞭毛虫/隐孢子虫快速检测，贾第鞭毛虫/隐孢子虫 ELISA	TechLab，美国(http://www/techlab.com)；Alere，美国(http://www.alere.com)	FDA/CE
ProSpecT 隐孢子虫微板 ProSpecT 贾第鞭毛虫/隐孢子虫微板	Thermo Fisher，美国(https://www.thermofisher.com)	FDA/CE
RIDA 隐孢子虫快检	拜发，德国(http://www.r-biopharm.com/products/clinical-diagnostics)	CE
三联寄生虫筛查(隐孢子虫、贾第鞭毛虫、痢疾阿米巴)	TechLab，美国(http://www.techlab.com)；Alere，美国(http://www.alere.com)	FDA

注：[a] 几乎所有试剂已经评估仅用于从临床便标本中检测人隐孢子虫和微小隐孢子虫，对于其他隐孢子虫的敏感性和特异性未知；[b] FDA. 美国食品和药品监督管理局；CE. 欧洲统一(医疗器械符合欧盟标准，可在这些国家合法销售)

表 145-3 用于检测粪便样本中隐孢子虫抗原的商业化免疫层析法试剂

产品	生产商或经销商	认证[a]
ImmunoCard STAT! 隐孢子虫/贾第鞭毛虫快速检测	Meridian Bioscience,美国(http://www.meridianbioscience.com)	FDA/CE
Xpect 隐孢子虫 Xpect 贾第鞭毛虫/隐孢子虫	Thermo Fisher,美国(https://www.thermofisher.com)	FDA/CE
隐孢子虫试纸条 隐孢子虫/贾第鞭毛虫试纸条	Coris BioConcept,比利时(http://www.corisbio.com)	CE
隐孢子虫试剂盒	Cypress Diagnostic 比利时(http://www.diagnostics.be)	CE
微小隐孢子虫(Crypto) 隐孢子虫-贾第鞭毛虫 隐孢子虫-贾第鞭毛虫-内阿米巴	CerTestbiotec,西班牙(http://www.certest.es)	CE
隐孢子虫 Stick 隐孢子虫-贾第鞭毛虫 Stick 隐孢子虫-贾第鞭毛虫-内阿米巴 Stick	Operon,西班牙(http://www.operon.es)	CE
RIDA 隐孢子虫快检 RIDA 隐孢子虫/贾第鞭毛虫联合快检 隐孢子虫/贾第虫/内阿米巴联合快检(试纸条或检测卡)[b]	拜发,德国(http://www.r-biopharm.com/products/clinical-diagnostics)	CE
IVD 隐孢子虫抗原检测	IVD Research Inc.,美国(http://www.ivdresearch.com)	FDA

注:[a] 几乎所有试剂已经评估仅用于从临床便标本中检测人隐孢子虫和微小隐孢子虫。对于其他隐孢子虫的敏感性和特异性未知。[b]FDA. 美国食品和药品监督管理局。CE. 欧洲统一(医疗器械符合欧盟标准,可在这些国家合法销售)

(三)PCR 检测

分子技术,特别是 PCR 和 PCR 相关的方法,已经被开发并应用于检测和鉴别隐孢子虫[104]。隐孢子虫的一些 PCR 检测试剂可以从市场上买到,大部分是针对主要腹泻病原体的(表 145-4)。它们具有很高的敏感性和特异性及检测混合感染的能力[125-132],而且它们可能导致隐孢子虫发现更频繁,这在腹泻病原体的检测中并不常见[133-134]。虽然 BD Max 肠道寄生虫检测盘、粪便寄生虫快速诊断试剂盒和 G-DiaParaTrio PCR 试剂盒仅针对 3 种主要的腹泻原虫,但它们可用于有针对性地调查发展中国家寄生虫相关腹泻病例[135-139]。随着价格的降低,预计在不久的将来在疾病暴发调查和疾病负担研究中使用这些胃肠检测方法的情况会增加。在分析部署在马里的欧洲士兵的粪便样本和重新分析全球肠病多中心研究的粪便样本中,内部多重定量 PCR 方法在评估腹泻病因方面的效用已得到证明[140-141]。

表 145-4 用于检测粪便样本中隐孢子虫 DNA 的商业化肠道试剂

产品	生产商或经销商	认证[a]
BD Max 肠道寄生虫测试板[b]	Becton Dickinson,美国,http://www.bd.com/en-us	FDA/CE
BioFire FilmArray 肠道测试卡[c]	BioFire,美国,http://www.biofiredx.com	FDA/CE
xTag 肠道病原体测试卡[c]	Luminex Molecular Diagnostics, Inc.,美国,https://www.luminexcorp.com	FDA/CE
粪便病原体 M[d] 粪便细菌和寄生虫[d] 粪便病原体 A[d] 粪便病原体 B[d] 粪便病原体 C[d] 寄生虫 (assays for HighPlex 384 platform)[d]	AusDiagnostics Pty Ltd,澳大利亚,http://www.ausdiagnostics.com	CE

（续 表）

产品	生产商或经销商	认证[a]
G-DiaPara[e]	Diagenode Diagnostics，比利时，https://www.diagenodediagnostics.com	CE
FTD 粪便寄生虫[c]	Fast Track Diagnostics Ltd.，马耳他，http://www.fast-trackdiagnostics.com	CE
NanoCHIP 肠道测试卡[c]	Savyon Diagnostics，以色列，http://savyondiagnostics.com	CE
EntericBio DX[f] EntericBio Parasite Panel 1[f] EntericBio Gastro Panel 2[f]	Serosep，爱尔兰，http://www.serosep.com	CE
Viasure，*Cryptosporidium*[f]	CerTest Biotec，西班牙，http://certest.es	CE
Cryptosporidium Tyzzer kit[f]	Liferiver，美国，http://www.liferiverbiotech.com	CE

注：[a]FDA. 美国食品和药品监督管理局；CE. 欧洲统一（医疗器械符合欧盟标准，可在这些国家合法销售）；[b]报道检测人隐孢子虫和微小孢子虫；[c]报道检测隐孢子虫；[d]报道检测人隐孢子虫、微小孢子虫、维瑞隐孢子虫、*C. meleagridis* 除了 *C. felis*，*C. muris* 和 *C. baileyi*；[e]报道检测人隐孢子虫和微小孢子虫；[f]报道检测隐孢子虫

七、分型系统

基因型和亚型分型已用于隐孢子虫感染的特征分析中，特别是在隐孢子虫病监测和暴发调查中。虽然对患者的管理不需要进行物种水平的鉴定，但考虑到单个隐孢子虫物种有独特的宿主范围，对隐孢子虫物种的鉴定可以对可能的暴露和感染源进行深入了解[8,10,12]。一些基于基因分型的种特异性的 PCR 限制性片段长度多态性分析(PCR-RFLP)，可以在种水平上检测和鉴定隐孢子虫，这些技术大多基于 rRNA 基因的小亚基[142-143]。其他基因分型技术主要基于鉴定微小隐孢子虫和人隐孢子虫，而不能检测和鉴定其他隐孢子虫或基因型[10,12]。近年来，基于 SSU rRNA 的定量 PCR 检测方法越来越多地用于人隐孢子虫、微小隐孢子虫和兔隐孢子虫的基因分型[144-150]。基于 SSU rRNA 的定量 PCR 方法快速对人类标本中 5 种常见隐孢子虫的基因分型进行了熔融曲线分析[151]。

一些基于 *gp60* 基因（也称为 gp40/15）的亚型分析工具已被用于微小隐孢子虫或人隐孢子虫多态性分析[8,10,12]。该基因的遗传异质性表现为亚型家族之间的序列差异和每个亚型家族内各亚型在基因开始时三核苷酸重复（TCA、TCG 或 TCT）数量的变化。有一个命名系统用于隐孢子虫亚型[8,10]的命名。隐孢子虫亚型的名称以亚型家族名称开头（对于 C. hominis 为Ⅰa、Ⅰb、Ⅰd、Ⅰe 和Ⅰf 等；对于 C. parvum 为Ⅱa、Ⅱb、Ⅱc 和Ⅱd 等）。其后是重复的 TCA（以字母 A 表示），TCG（以字母 G 表示）或 TCT（以字母 T 表示）的数量。因此，名称ⅠbA10G2 表示该亚型属于人隐孢子虫Ⅰb 亚型家族，并且在该基因的三核苷酸重复区域中具有 10 个 TCA 重复序列和 2 个 TCG 重复序列。现在，亚型分型工具通常在调查隐孢子虫病暴发[72,73,75,84,152-160]中应用。基于 gp60 序列分析对微小隐孢子虫和人隐孢子虫进行亚型分型是当前分子监测系统 CryptoNet 的关键组成部分，该系统促进了对美国近期隐孢子虫病暴发的调查[74,159,161]。

高分辨率多位点亚型分析工具已被开发用于微小隐孢子虫和人隐孢子虫[162-164]分析。随着二代测序技术和隐孢子虫 DNA 的分离及富集技术的发展[165-168]，全基因组测序已越来越多地用于隐孢子虫标本的深层次表征[169-173]分析上。在一些主要的 gp60 亚型的进一步分型中需要这些新工具，例如，人隐孢子虫的ⅠbA10G2 和微小隐孢子虫的ⅡaA15G2R1[163,171,173,174]。人类致病隐孢子虫全基因组测序将被纳入下一代 CryptoNet。

八、病原分离

目前，隐孢子虫体外培养虽然有一些进展，但仍不容乐观[175]。隐孢子虫寄生虫和卵囊产量低，使其分离培养和诊断受限。因此，隐孢子虫的分离和培养还没有在临床实验室中进行。早期隐孢子虫体外培养已在几个上皮细胞系（HCT-8、MDBK、Caco-2 等）广泛用于研究，以此来评估可能的药物、卵囊消毒方法及卵囊生长、分化和生化特

征[176-177]。利用低温保藏技术长期保存孢子虫，中空纤维技术或三维人体肠组织生物工程体外培养技术，可以促进隐孢子虫的分离以用于诊断和分型[178-180]。

九、治疗

硝唑尼特是美国FDA批准的唯一可用于治疗正常人群隐孢子虫病的药物[181]。口服或静脉补液和注射抗动力药被广泛用于隐孢子虫病引发的重症腹泻。临床试验表明，硝唑尼特可以缩短病程，降低寄生虫负荷[182-183]。在发达国家和发展中国家，它均被有效地用于临床治疗隐孢子虫病[184-185]。然而，该药物对免疫功能缺陷患者感染隐孢子虫无效[182,186]。巴龙霉素和螺旋霉素可用于治疗这类患者，但其疗效尚未得到证实[183,186-187]。

在发达国家，治疗和预防艾滋病患者感染隐孢子虫最有效的方法是高效抗逆转录病毒疗法(HAART)[183,187-188]。这也是发展中国家预防HIV阳性者感染隐孢子虫病的最有效方法[189-190]。人们认为根除和预防隐孢子虫感染与给患者补充$CD4^+$细胞，以及在HAART治疗中给予抗隐孢子虫活性的蛋白酶抑制剂(如茚地那韦、那非那韦、利托那韦)[187,191]有关。艾滋病患者隐孢子虫病复发常见于停止高效抗逆转录病毒治疗后[192]。有报道表明，尽管接受高效抗反转病毒治疗的HIV阳性患者感染隐孢子虫概率比未接受高效抗反转病毒治疗的HIV阳性患者低，但前者隐孢子虫感染仍然很常见[53-54,193-195]。

近来确定隐孢子虫病是发展中国家儿童中到重度腹泻和腹泻相关死亡的主要原因之后[196-198]，针对隐孢子虫病的有效治疗方法的开发受到了越来越多的关注。随着对隐孢子虫代谢研究的不断深入，一些隐孢子虫的分子靶点在药物开发方面显示出良好的前景，包括钙依赖性蛋白激酶、磷脂酰肌醇-4-OH和其他激酶及乳酸脱氢酶。在最近的一系列研究中，鉴定了这些隐孢子虫酶中的几种选择性抑制剂[177,199-204]。已有几组用于治疗其他病原体的药物被确定为治疗隐孢子虫病的潜在特制药物[197]。

十、结果的评价、解释和报告

虽然在美国仅有1.4%的实际诊断病例[6,15]，但是美国大多数州和其他发达国家，隐孢子虫病是一种法定传染病。因此，一旦在粪便或组织中检测出隐孢子虫，除了告知医生外还应及时上报当地卫生部门。因大多数常规诊断方法不能鉴定隐孢子虫物种，故在粪便或其他样本中，检测出隐孢子虫卵囊或抗原时，即作为隐孢子虫阳性病例上报，可不鉴定物种。基于此病例报告制度，从公共卫生角度来看，在发达国家，大量隐孢子虫病病例的报告可能预示着隐孢子虫病的暴发或诊断试剂盒出现假阳性结果[205-209]。因此，用DFA或PCR方法确认检测结果，并报告国家和当地公共卫生部门至关重要。在每次检测时均需设立阳性对照和阴性对照，并严格遵守推荐的操作方法，将减少误差。在美国，州与地方流行病学专家委员认可用快速免疫层析方法检测出的隐孢子虫阳性者为隐孢子虫病疑似病例，诊断结果需再次检测确认，例如，DFA、EIA和PCR方法检测。在明尼苏达州和田纳西州，州法规要求所有的隐孢子虫阳性标本都要提交到州公共卫生实验室进行验证性测试和分子鉴定。

这篇报道中的发现和结论，仅为作者的观点，并不代表国家疾病预防控制中心的观点。

参考文献请扫二维码查阅

第146章 线 虫

HARSHA SHEOREY，BEVERLEY-ANN BIGGS，NORBERT RYAN

（贾伟 译；陈家旭 审校）

线虫（nematodes）呈圆柱形，虫体不分节，体腔内有消化道和生殖系统，雌雄异体。缺乏环肌，通过伸展身体运动。分为4个幼虫期和成虫期，在大多数情况下，第三期幼虫为感染期幼虫。

肠道线虫（intestinal nematodes），包括土源性蠕虫（soil-transmitted helminths，STH），是全球最常见的病原体，超过15亿人感染，尤其是在资源贫乏、卫生设施不完善的热带亚热带地区。这些寄生虫病在妇女和儿童中发病率高，是健康水平低下的主要原因，被世界卫生组织（WHO）列为“被忽略的热带病”[1]。根据定义，STH感染是蛔虫、鞭虫和钩虫感染。尽管圆线虫也经土壤传播，但它在人类宿主内繁殖的能力与其他蠕虫不同。

然而，有一个令人信服的论点认为，圆线虫病也应该与STH[2]一起考虑，并且控制措施应该包括在地方病流行地区的STH治疗方案中[3]。在发达国家，移民、难民、旅行者和退伍军人在离开这些线虫病流行区后，通常会在不知情的情况下携带这些寄生虫数年。这在这些国家，对提供卫生服务及制定管理不常见感染的指南（例如，澳大利亚内部制定的指南[4]）产生了影响。全球性的，致力于开展针对在校儿童土源性蠕虫感染的化疗防治工作，已降低了这些疾病在许多低、中收入国家的流行[3]（http://www.who.int/intestinal_worms/en/）。通过在高危人群中定期使用驱虫药进行治疗，可以减少人类因STH感染引起的慢性病发病率。但是，治疗方案的监测和评估是费力的，并且需要更新的技术来评估方案的有效性。由于驱虫需要区分已得到控制的寄生虫感染人群和需要进一步治疗的人群，因此，多重定量PCR或类似的高通量分子诊断方法可能会在将来提供新的重要诊断信息[5]。

传统的实验室诊断主要基于粪便显微镜检查，区分种属则基于所检测到的卵或幼虫的形态（图146-1至图146-3）。显微镜检的敏感性受到处理方法的影响，如直接显微镜、乙酸甲醛乙酯浓度或Kato-Katz涂片，还受到排出的卵或幼虫数量变化等因素的影响。有时，成虫可以进行组织学处理，成虫和卵的特征可用于鉴别寄生虫（图146-4）。肠道线虫的分子诊断（包括实时多重PCR）[6]正逐步在推广，但在本文撰写时，在诊断实验室中还不常用。特别是类圆线虫的检测存在敏感性问题；在慢性感染中，幼虫的数量可能很少，它们是间歇性地从粪便排出。尤其是圆线虫每天产卵的数量据估计只有30～50只。与STH的产量相比，这种极低的产卵量导致在筛查该虫种时遇到一些诊断困难。此外，由于PCR检测的样本量较小，除非进行多个粪便样本检测，否则敏感性可能仍然很低[7]。

最近由世界卫生组织更新了预防性化疗方案[1]。针对类圆线虫感染的全球趋势和管理选择（包括在免疫抑制之前对高危人群的预防）已经更新[8-10]。有关寄生虫药敏试验的详细信息，请参阅第154章。

一、线虫的分类

线虫的形态特征丰富多样，是线虫分类的基础。在虫体前端，口部具有吸附或穿透作用的结构，可包括棘、钩齿或切板。咽管短而空腔状或呈长毛细管状。食管的形态也各不相同，但通常终于一个肌肉球。在雄性线虫，尾部有尾乳突和交合刺[骨化交配附器（sclerotizedcopulatory aids）]。大多数线虫，雄性虫体比雌性具有更多有用的分

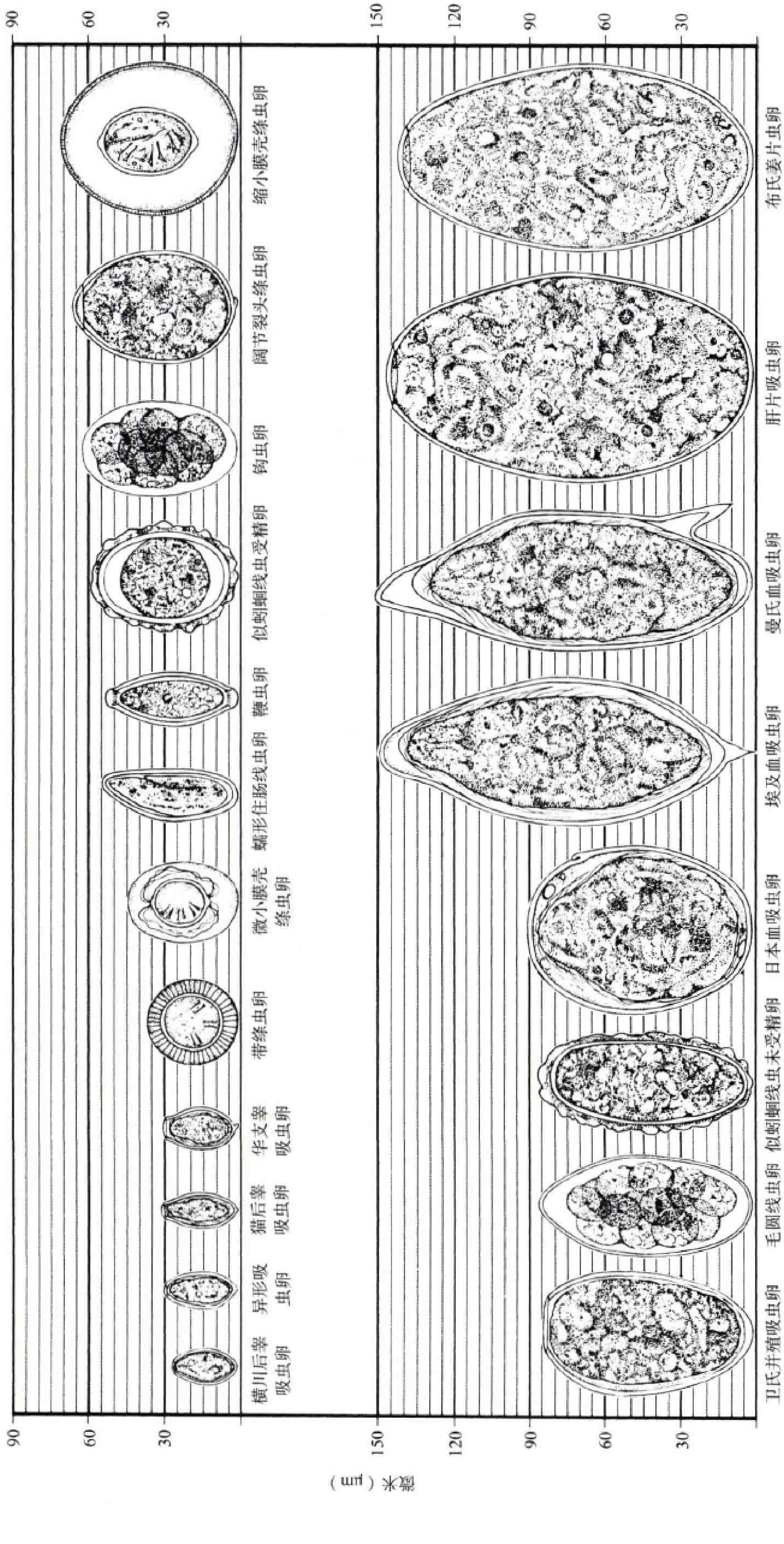


图 146-1 蠕虫卵的相对大小图

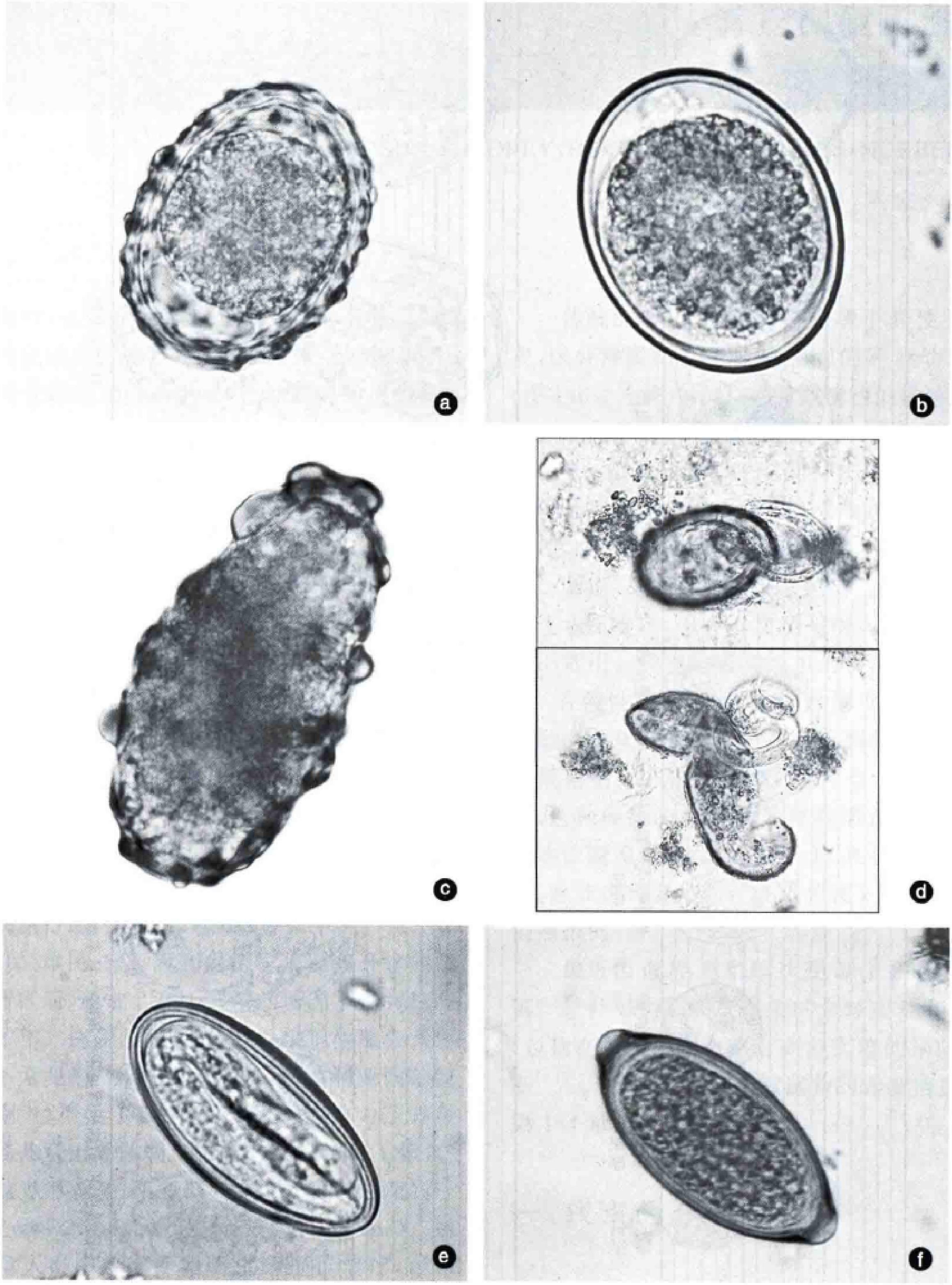


图 146-2 各种肠道线虫的卵(放大倍数,×850)

注:a. 受精蛔虫卵;b. 脱蛋白膜受精蛔虫卵;c. 未受精蛔虫卵;d. 正在孵化幼虫的受精蛔虫卵,由PamSmith,Royal Drawin Hospital 提供;e. 含胚感染性蛲虫卵;f. 鞭虫卵,见彩插

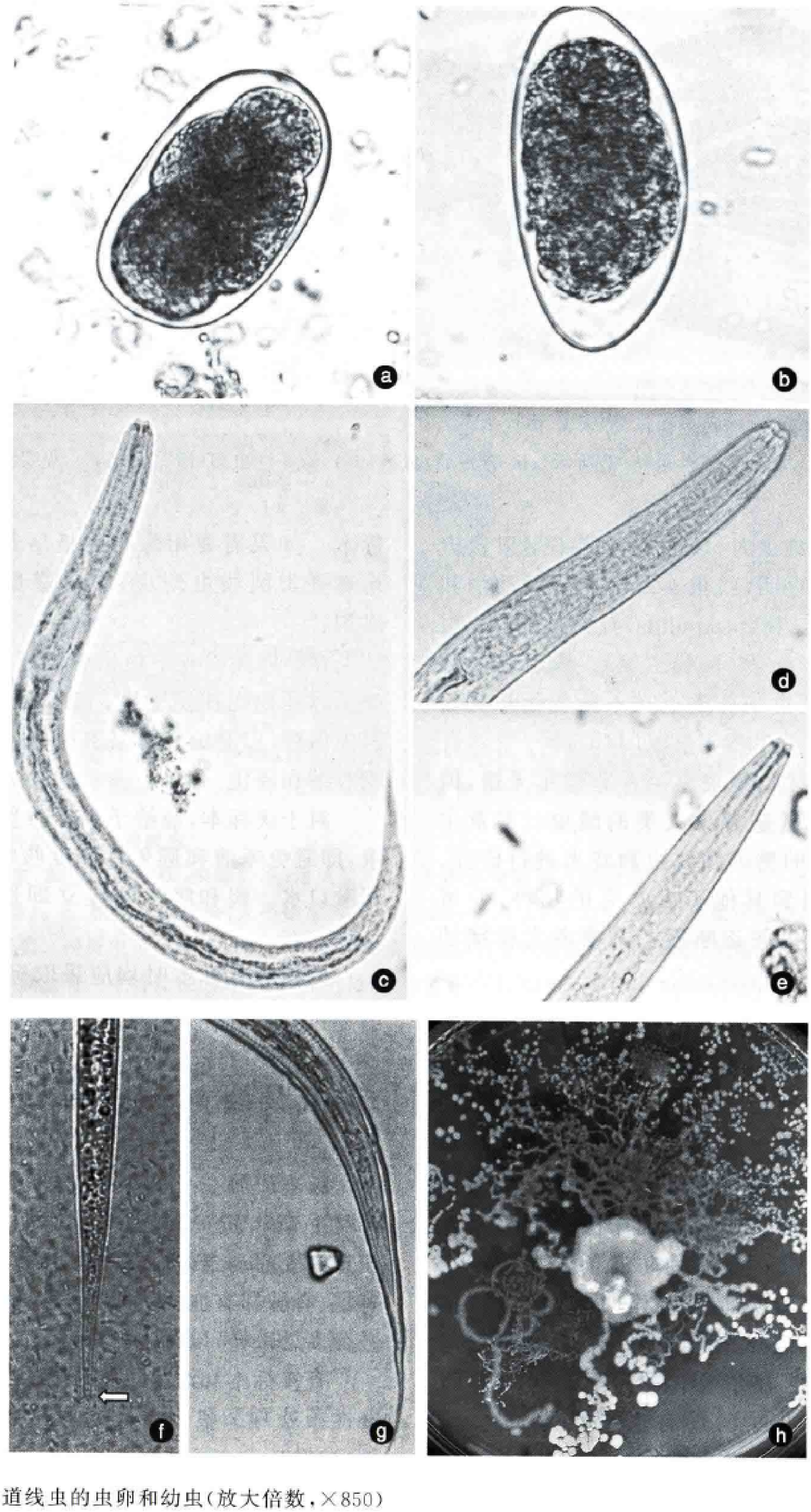


图 146-3 肠道线虫的虫卵和幼虫(放大倍数,×850)

注:a. 钩虫卵;b. 毛圆线虫卵;c. 粪类圆线虫杆状蚴或第一期幼虫;d. 粪类圆线虫前端,短口腔;e. 钩虫杆状蚴前端,长口腔;f. 粪类圆线虫丝状蚴或晚期幼虫尾端,凹口(箭所示);g. 钩虫丝状蚴或晚期幼虫尾端,尖细;h. 琼脂平板培养基显示,幼虫在琼脂表面和内部运动,形成的细菌菌落痕迹,因幼虫具有感染性,粪便标本放在平板的中间,密封培养,见彩插

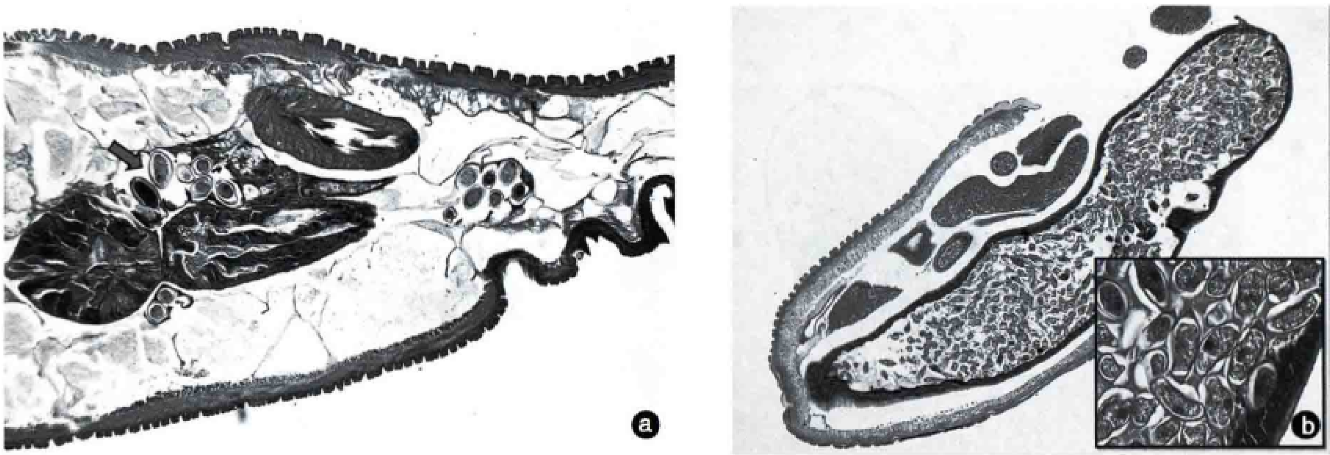


图 146-4 结肠镜检，雌性蠕虫切片(苏木素-伊红染色)
注：a. 蛲虫雌虫(×400)特征性虫卵(箭所示)；b. 鞭虫雌虫(×100)、特征性虫卵(插图，×400)，见彩插

类信息。在没有雄虫时，仅雌虫可能不足以鉴定虫种。研究结果表明，线虫实际上与节肢动物和最新命名的曳鳃动物(priapulids)有关。所有线虫属于动物界，线形动物门(线虫纲)。随着新的分子技术的应用，线虫的分类也在不断变化和更新(详情请见第 135 章和参考文献[11])。

下面详细描述的线虫感染并非详尽无遗，但也包括了在全球普遍感染人类的线虫。本章主要对土源性蠕虫的粪类圆线虫和蛲虫进行研究。可能会不时地遇到其他不太常见的物种，并可能需要涵盖人和兽医诊断服务的参考实验室的协助。

二、标本的收集、运输和存储

应在使用抗生素或抗寄生虫药之前收集标本(第 136 章)。尽快运输和处理粪便标本进行寄生虫检查很重要。应鼓励临床医生和采集人员将新鲜标本或使用市售的防腐剂盒即送往实验室。如果不可避免地要耽误时间，应将标本放入市售的小瓶或试剂盒中，并用诸如聚乙烯醇或乙酸钠-乙酸-福尔马林的防腐剂进行冷藏或运输。如果在采集时没有这些，应在实验室收到标本后立即添加防腐剂。这些工具提供了正确收集的指导。防腐剂的选择取决于各种考虑因素，例如，是否需要永久性染色涂片或免疫测定法(有关详细信息请见参考文献[12])。最好在 7～10 天内收集 2 个或 3 个标本，小体积或明显干燥的标本应予以剔除，并应收集新鲜标本。如果需要用琼脂平板培养法或贝尔曼法培养粪类圆线虫幼虫，则应避免冷藏和使用防腐剂。

在结肠镜检查中检出或由患者提交的蠕虫应毫不迟延地送往实验室。蠕虫可以在 60% 的乙醇中保存，应避免使用福尔马林，因为它会导致组织收缩和硬化。

对于痰标本，应给予患者适当的指导，强调要求，即避免唾液和避免在深度咳嗽(咳痰)之前使用漱口水。痰和吸出物应立即送到实验室进行处理。

处理所有标本时均应采取标准的预防措施，例如，任何人都应佩戴乳胶手套处理标本。

三、直接检查

标本应放在工作柜(生物安全柜)中处理，并穿戴手套和防护服。检查标本，注意其稳定性。注意有无浮动虫体(图 146-5a，b)或虫体片段。对有水、有脓和有血的区域取样。如果粪便成形，应进行多处采样，以便进行浓集。

直接标本和浓缩物都要在盐水和碘酒中进行湿性预处理。整个上腹区域应以低倍镜(×100 倍)扫描。大多数蠕虫卵和幼虫可以通过这种放大镜来识别，并根据它们的形状、大小和特征在高倍镜(400×)下确认诊断(图 146-1 至图 146-3)。为了永久着色，涂片应离心沉淀(500×g，10 min)，但这种技术并不是鉴定线虫卵或幼虫的首选方法，它主要用于诊断线虫与原虫的混合感染。

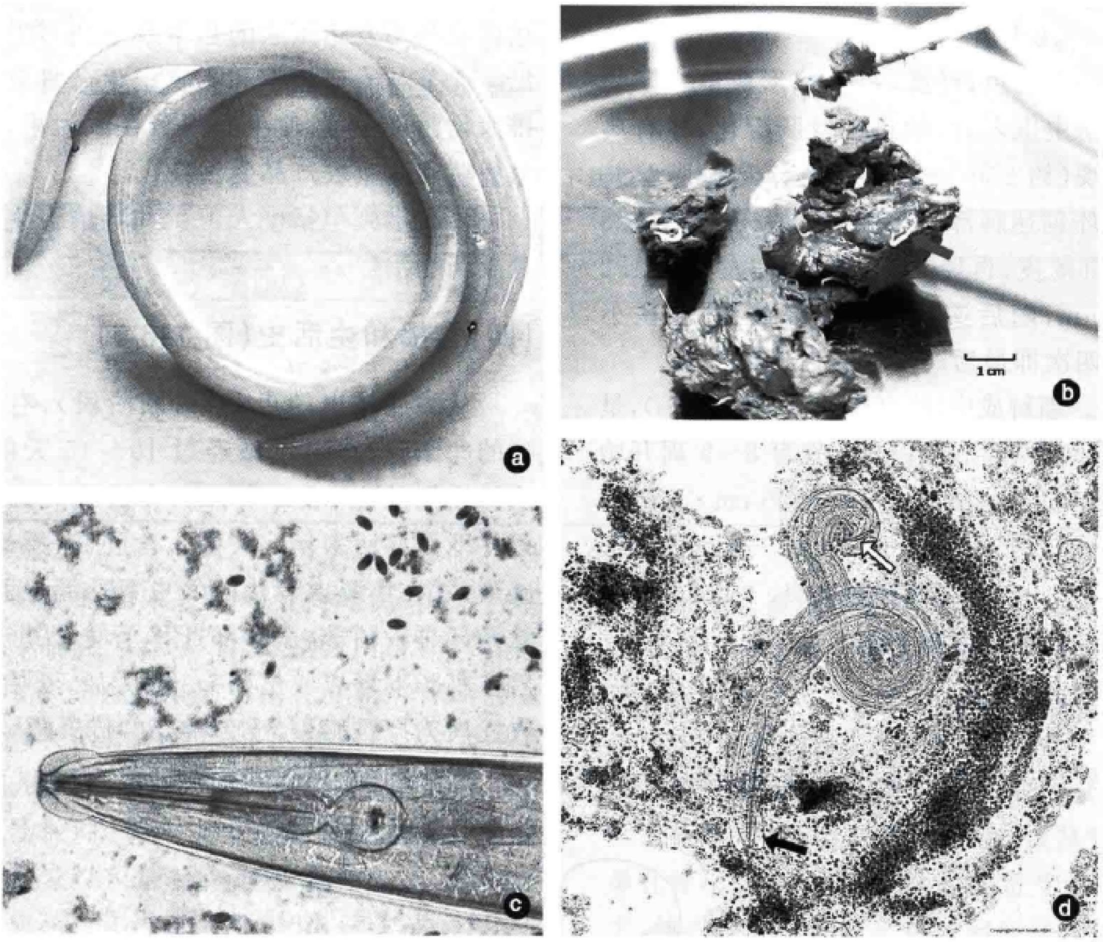


图 146-5 各种肠道线虫的成虫

注：a. 蛔虫成虫，典型的圆柱状，末端尖细，角质层厚，是人体感染的最大的线虫，体长 15～35 cm。b. 粪便中的成虫（箭所指）。c. 雌性蛲虫成虫，大小通常为（8～13）mm×（0.3～0.5）mm。如图显示雌虫的前端有一个特征性的颈翼膜。视野中可见典型虫卵。d. 成年雄虫的前端具有特征性的宫颈翼膜（黑箭所指），仅偶尔在粪便中见到。后端还有一个特征性的针刺（白箭所指）。由皇家达尔文医院的 Pam Smith 供图，见彩插

四、似蚓蛔线虫（*Ascaris lumbricoides*）

（一）分类

在现代生物物种分类中，该组中的生物位于线虫的第三进化枝色矛亚纲（Chromadoria）：旋尾亚目（Spururina）：蛔目（order Ascarida）：蛔科（family Ascarididae）。

在三种常见的蛔虫科线虫中，仅蛔虫属为真正的人体寄生虫。其他属［弓首蛔虫属（*Toxocara*）和弓蛔属（*Toxascaris*）］为犬猫常见寄生虫，偶尔感染人。蛔虫与异尖线虫（anisakids）相关，有 3 个明显的唇瓣，但它们的生活史不同，与陆地环境而与水生环境无关。

猪蛔虫（*Ascaris suum*）被认为是猪源的一个独立种，但最近发现与人蛔虫基因相似[13]。

（二）病原描述

1. 虫卵 蛔虫卵（图 146-2a～d）常见两种状态——受精卵和未受精卵。受精卵，（45～75）μm×（35～50）μm，卵壳由具选择通透性能的内脂层，结构结实的几丁质蛋白层和外卵黄层构成。内层含有脂蛋白，即蛔甙层，有助于阻止甲醛、消毒剂和其他化学物接触胚胎。受精卵的外表面有一层不均匀的，具有黏附性能的黏多糖沉积物。虫卵因染有胆汁呈棕黄色。未受精的蛔虫卵蛋白质膜薄，虫卵通常更细长，大小为（85～95）μm×（43～47）μm，蛋白质膜可能明显、或很少、或没有。如果仅有未受精卵，表示肠道内只有雌虫。有时能看到孵化的幼虫（图 146-2d）。虫卵发育过程中，虫体提供足够的营养保证受精卵发育为第

二期感染性幼虫并能继续存活。

2. 幼虫 在土壤中，经过 2～3 周孵育，受精卵发育成第一期幼虫，经卵内蜕皮，形成第二期幼虫。随后被宿主摄入后，幼虫在空肠孵化，并有典型的丝状外观(约 250 μm×14 μm)，穿过肠壁并进入血液循环到达肺部，发育到接近 560 μm×28 μm，进入肺部蜕皮，再经 8～9 天发育，发育至 1.2 mm×36.0 μm，随后逆行至咽喉部被吞下，在小肠内发生第四次即最后一次蜕皮后迅速生长。

3. 成虫 新鲜成虫，雌虫和雄虫(图 146-5a)，呈浅棕色到浅粉色，保存后成白色。发育 8～9 周开始产卵，此时雌虫长 15～20 cm，可长至 45 cm×5 mm；雄虫一般较小，为(15～31)cm×3 mm。雄虫的尾部弯曲，有泄殖腔，一对交合刺和尾乳突。成虫寄生在小肠腔内，以肠内消化产物为食。

(三)流行病学和预防

蛔虫感染是人类最常见的传染病之一，全世界超过 10 亿人感染。尽管呈世界性分布，但以发达国家和不发达国家的热带及亚热带地区最为常见。尤其与人口拥挤和不良卫生条件有关。人的排泄物污染土壤，使虫卵附着在淤泥里，很容易导致根茎和蔬菜农产品受污染。

预防措施包括个人卫生和环境卫生的健康教育及药物治疗。

(四)传播和生活史(图 146-6)

从粪便排出的虫卵(诊断阶段)，有一个未分裂的卵细胞，在土壤中经过 10～15 天的发育，形成感染期幼虫(表 146-1)。在适宜的温度和湿度条件下可存活多年。人摄入含胚卵(感染阶段)而感染，并在小肠内孵化。幼虫穿透肠黏膜，通过静脉循环进入肺部，从肺部迁移至气管并被吞咽，随后在小肠发育成成虫，60～70 天后，开始产卵。少数发展为严重感染，成为重要的传染源。

潜伏期(从摄入虫卵到排卵)约为 2 个月。

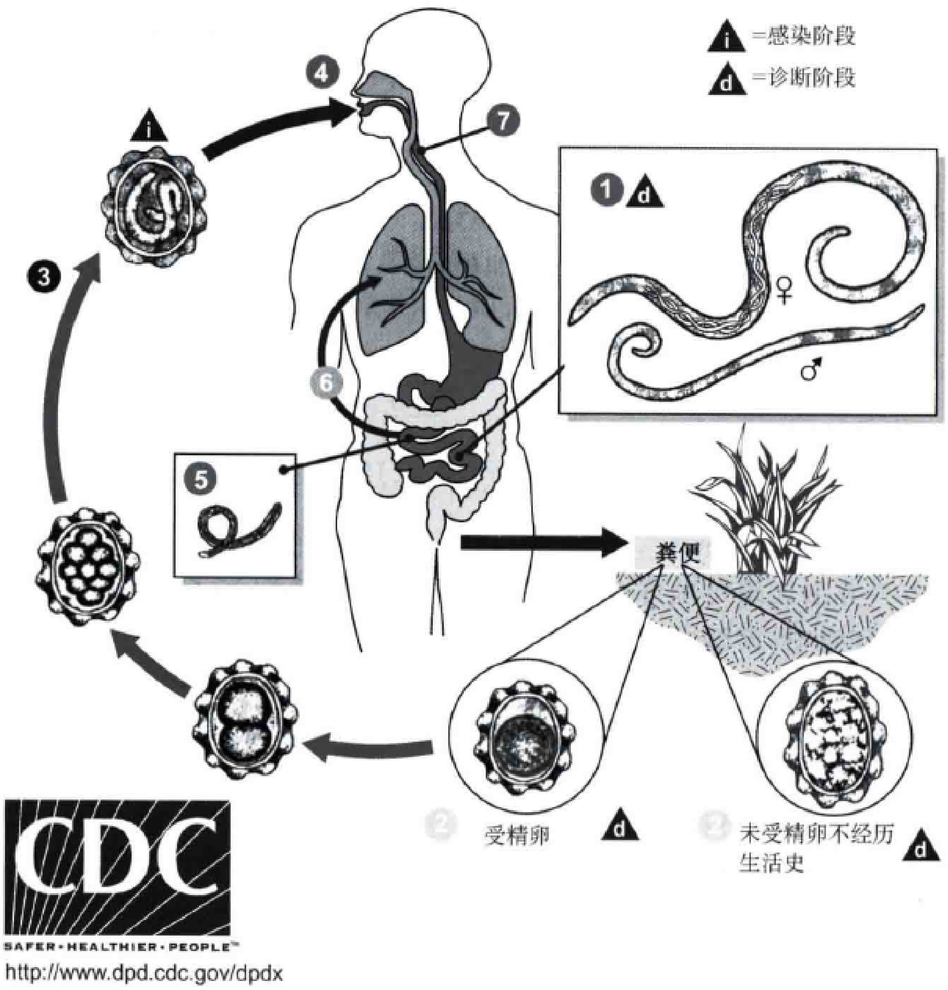


图 146-6 蛔虫生活史

(五)临床表现

初始感染通常无症状,幼虫在肺部的迁移可导致嗜酸性粒细胞性肺炎,表现为咳嗽、发热和呼吸困难。这可能发生在感染后2周,持续约3周。有明显的支气管痉挛,偶可致命。

表146-1 适宜条件下线虫完成生活史时间

线虫	完成生活史时间	
	宿主内(周)	外部环境(天)
蛔虫	8	10～15
蛲虫	4～7	1/4
钩虫	4～7	5～6
粪类圆线虫	4	3～4
鞭虫	10～12	21

蛔虫感染的临床表现与虫荷相关,大多数的感染表现很轻且无症状,但可能会出现非特异性的腹部症状。重症感染时引起儿童营养障碍和发育不良。肠梗阻是一种罕见的并发症,发生在虫荷很高的儿童中,某些情况下死亡率很高[3]。成虫在逃离肠腔时,偶尔会发生异位蛔虫症。这可能是一个自发性反应或是对发热性疾病、药物或麻醉的反应。虫体可进入肝胆管、胰管或阑尾,引起梗阻、导致胆绞痛、胆囊炎、急性胆管炎、急性胰腺炎、阑尾炎或肝脓肿。蛔虫感染在寄生虫流行的高感染率国家更常见(更多似蚓蛔线虫的临床表现见参考文献[14])。

(六)诊断

1. 显微镜检查 蛔虫感染的诊断主要依据粪便中检查到虫卵[7,8]。受精卵呈圆形或椭圆形,胆汁染色,表面有凹凸不平的蛋白质膜,卵壳厚。在同一标本中可同时查见受精卵和未受精卵,有时需要连续数日采集样本。浓集法如福尔马林乙酸乙酯沉淀法被用作最佳方法。未受精卵浓度较高时不宜用漂浮法。蛋白质膜脱落的受精卵和未受精卵难以识别(图146-2a～c)。活的幼虫有时可被咳出,但很少在粪便中被发现。

2. 宏观检验 偶尔,尤其是在儿童,成虫(通常是雌性)可能会从粪便排出,或从肛门、口腔或鼻孔穿出。因无其他的人体寄生虫与蛔虫一样大,故鉴定相对比较简单。但应注意的是,偶尔有从厕所里捡获类似蛔虫大小的蚯蚓送交鉴定的。蛔虫成虫的显著特点,末端尖细(图146-5a),体表沿着体长有白色侧线,3个唇瓣和一个坚韧的角质层。

(七)治疗

阿苯达唑和甲苯达唑为有效治疗药物(第152章)[1,14],但不能用于妊娠早期或<12个月的儿童。WHO推荐在妊娠中晚期和>12个月的儿童使用。

蛔虫概述见表146-2。

表146-2 常见线虫概述

寄生虫	感染后主要临床表现	潜伏期	实验室检查	首选治疗方法
蛔虫	临床症状与虫荷有关;大多数为轻度感染且无症状;移行期出现嗜酸性粒细胞肺炎 长期症状如下: ·有排出/吐出成虫史 ·轻度胃肠道症状 ·儿童虫荷严重时小肠梗阻 ·异位蛔虫症,阑尾、肝胆、胰腺管 ·儿童营养不良和发育迟缓	2个月	粪便检查见虫卵成虫排出 嗜酸性粒细胞降低或缺失	阿苯达唑或甲苯达唑

（续　表）

寄生虫	感染后主要临床表现	潜伏期	实验室检查	首选治疗方法
蛲虫	大部分感染无症状；主要在夜晚发生肛门瘙痒；常通过抓挠导致继发感染；一般症状包括体重减轻、食欲缺乏，偶尔异位蛲虫，包括阑尾和女性生殖道	3～4 周	胶纸法查到虫卵 嗜酸性粒细胞降低或缺失	阿苯达唑或甲苯达唑；防止再感染或治疗接触者
钩虫	幼虫钻入皮肤点出现瘙痒性皮疹或钩虫痒；移行期由于嗜酸粒细胞性肺炎导致咳嗽和气喘；长期感染症状如下： ·缺铁性贫血 ·儿童低蛋白血症导致慢性营养不良和生长障碍 ·胃肠症状及肠下垂 ·轻度感染可能无症状	4～8 周	粪便检查见虫卵或幼虫；培养（琼脂平板或 Harada-Mori 技术）嗜酸性粒细胞缓慢增高	阿苯达唑或甲苯达唑；贫血者补充铁剂
粪类圆线虫	自身感染引起慢性感染；复发、迁移；当幼虫进入肛周皮肤时引发线性皮疹或“幼虫流”，也可发生荨麻疹；肠下垂引起间歇性或慢性腹泻，有时伴有吸收不良；自身感染引起肺部症状与嗜酸性粒细胞增多；吕弗勒综合征；由于幼虫迁移使肠道菌群转移导致革兰阴性菌败血症；免疫功能低下或损伤者，引起高度感染综合征（传播性），导致严重肠下垂和呼吸道症状	2～4 周	粪便检查见幼虫；培养（琼脂板或原田 Harada-Mori 技术）；血清查到抗体；嗜酸性粒细胞缓慢增高，PCR 检测高度特异，但是敏感性易变	伊维菌素
鞭虫	一般无症状或轻度胃肠道症状；上腹痛，呕吐，腹胀，厌食，体重减轻；重度感染患者引起鞭虫性痢疾，有时伴有直肠脱垂；由于慢性营养不良和贫血导致儿童生长迟缓	3 个月	粪便检查见虫卵；嗜酸性粒细胞减少或缺失	阿苯达唑或甲苯达唑

五、蠕形住肠线虫（蛲虫）（*Enterobius vermicularis*）

（一）分类

在现代生物物种分类中，该组中的生物位于线虫的第三进化枝色矛亚纲（Chromadoria）：旋尾亚目（Spururina）：尖尾目（order Oxyurida）：尖尾科（family Oxyuridae）。

只有尖尾科蛲虫常感染人和灵长类动物。

（二）病原描述

1. 虫卵　蛲虫卵（图 146-2e），呈卵圆形，（50～60）μm×（20～35）μm，两侧不对称，一侧扁平，在肛周皮肤获得的虫卵无色。卵壳外层含有蛋白质，具有黏性，使虫卵容易黏附于皮肤。虫卵内含有未成熟的第一期幼虫，可迅速发育，具有感染性。

2. 幼虫　幼虫在小肠孵化，然后迁移至大肠并完成蜕皮和发育。

3. 成虫　雌虫（图 146-5b，c）（8～13）mm×（0.3～0.5）mm，头部有头翼或像翅膀一样张开，尾部长而尖（故名针状虫，即蛲虫）。雄虫 2.5 mm×0.2 mm，但很少见（图 146-5d）。

格氏蛲虫（*Enterobius gregorii*）为蛲虫姊妹种，有一个稍小的交合刺（性器官）。但对其是否为独立种存在争议。因分子生物学分析未见差异，一些专家认为格式蛲虫是蛲虫幼虫或未成熟的蛲虫。

（三）流行病学和预防

蛲虫呈世界性分布，儿童比成人更常见。

预防措施包括个人卫生和环境卫生健康教育及药物治疗。

（四）传播和生活史（图 146-7）

成虫寄生于盲肠、阑尾和升结肠。雌虫成熟时迁移至结肠，并在肛周及会阴部皮肤产卵（诊断阶段），每条可产万余个卵，6 h 内发育成感染期虫卵，可存活 5 天以上。

传播方式，直接经肛门及肛周-手-口方式形成自身感染，通常是指甲感染，或暴露于被虫卵污染的环境中而感染。虫卵摄入后，含蚴卵（感染期虫卵）在小肠孵化，幼虫迁移到大肠，发育成成虫。幼虫也可从肛周皮肤迁移返回直肠逆行感染。

潜伏期（从摄入虫卵到产卵）为 3～4 周。

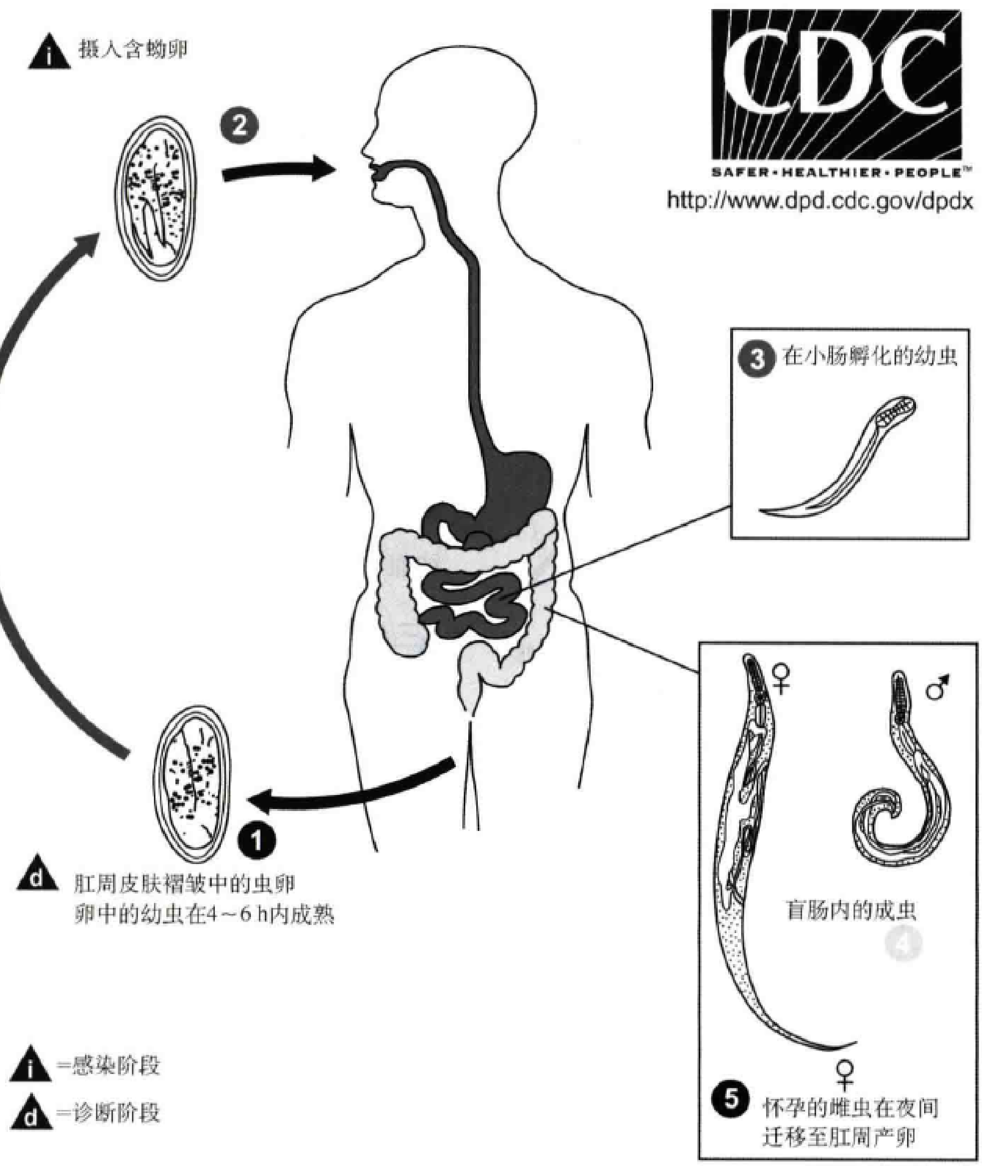


图 146-7 蛲虫生活史

(五)临床表现

蛲虫最常见于儿童感染。许多患者无症状或出现肛门和会阴瘙痒，瘙痒非常严重，尤其在夜间更严重，抓挠后经常出现继发细菌感染。当体内感染蛲虫量过高时，表现为注意力不集中、遗尿和情绪抑郁等。一般表现为腹痛、体重减轻和食欲减退。偶尔，蛲虫进入阑尾导致发炎[15]。也可发生重复感染(自身感染或逆行感染)。

蛲虫和虫卵可异位寄生，包括女性泌尿生殖道、附睾和腹膜。其中一些类似瘤样病变[16]或子宫内膜异位。它们很少引起严重的并发症。(有关蠕虫临床意义的更多信息请见参考文献[14])

(六)诊断

1. 显微镜检查 蛲虫感染的主要诊断方法是通过透明胶纸法，在会阴部皮肤查到虫卵(虫卵黏附在胶带上，显微镜检查)。简而言之，将胶带有黏性的一侧向外放在显微镜玻片上，紧紧地在肛周左右的褶皱部按压。然后，有黏性的一方向下平铺在玻片上，直接在显微镜下检查。将胶带从玻片上提起，滴加一滴二甲苯或二甲苯替代物，再将胶带黏在玻片上，可提高虫卵的可见度。这有助于清洁玻片及清晰地观察虫卵[17-18]。如果错误地用不透明的胶带镜检，在胶带上滴一滴镜油即可使镜检变得清楚。可能需要连续 2～3 天重复检查。商业化的蛲虫采集工具包[Evergreen Sci-

entific, Los Angeles, CA, 或 Swube(Becton Dickinson), Sparks, MD]已在一些国家使用。偶尔可在粪便中查到虫卵，不被胆汁染色，卵圆形，典型的不对称特征(一侧平一侧凹)、光滑、壁厚，可能含有部分或完全发育的幼虫(图 146-2e)。标本采集的最佳时间为早晨洗澡前或如厕前。

2. 宏观检验 雌虫可见于肛周的粪便中或结肠镜检像白色或淡黄色线头样的虫体。在极少数情况下，可能会在粪便中发现未成熟的、口部缺乏翼状扩张的蛲虫。膨大的雌虫含有大量的卵，通过在阴唇上施加压力可将卵从生殖孔中挤出(图 146-5c)。成年雌虫组织切片的横截面图中可见特征性的卵(图 146-4a)。

(七)治疗

阿苯达唑和甲苯达唑是首选治疗药物。妊娠妇女避免使用该类药物，噻吩嘧啶和哌嗪类药物也有效，且孕妇也可使用(第 152 章)[1,14]。

对家庭其他患者和密切接触者进行治疗，以及清洗床单和衣服，净化环境亦很重要。建议注意卫生，勤洗手。

蛲虫概述见表 146-2。

六、钩虫(*Hookworms*)

(一)分类

在现代生物物种分类中，该组中的生物位于线虫的第五进化枝色矛亚纲(Chromadoria)：小杆亚目(Rhabditina)：类圆线虫目(orderStrongylida)：钩虫科(family Ancylostomatidae)。

钩口线虫和板口线虫是钩虫的 2 类感染人的虫属，包括十二指肠钩虫(*Ancylostoma duodenale*)(旧大陆钩虫)、锡兰钩虫(*Ancylostomaceylanicum*)(主要来自亚洲和太平洋群岛)[19]、美洲钩虫(*Necatoramericanus*)(新大陆钩虫)。

(二)描述

1. 虫卵 十二指肠钩虫、锡兰钩虫和美洲钩虫的虫卵(图 146-3a)不易区别。呈卵圆形、壳薄、(56～75) μm×(36～40) μm。卵壳和卵胚之间有明显空隙。排出体外的虫卵仅停留在四细胞时期。幼虫在潮湿阴暗温暖的土壤中发育，1～2 天孵化。

2. 幼虫 自卵内孵化出的第一期杆状蚴(图 146-3 e,g)，长约 200 μm，以有机质为食，5～8 天内蜕皮 2 次。第三期感染性幼虫，不进食，长 500～700 μm。十二指肠钩虫比美洲钩虫长，感染性的丝状蚴可在土壤存活数周。曾利用丝状蚴形态的不同来区分十二指肠钩虫和美洲钩虫。然而，十二指肠钩虫丝状蚴与美洲钩虫丝状蚴具有相同的形态学特征(后鞘上显著的条纹)，因此可能使二者在以前的研究中被错误识别[20]。

3. 成虫 这 3 种钩虫的雄虫(5～11 mm)都比雌虫[(7～13)mm×(0.4～0.5)mm]短，十二指肠钩虫比美洲钩虫更长且更大。还可以根据它们在嘴部及尾部和颊部解剖学上的解剖学差异来区分这 3 种钩虫。因为成虫牢牢地黏附在肠黏膜上，通过刺穿毛细血管网以血液为食，所以很少见。

(三)流行病学和预防

据估计，在热带和亚热带的贫困地区，尤其是亚洲、拉丁美洲、加勒比和撒哈拉以南非洲地区，有 7.4 亿人感染钩虫[3]。十二指肠钩虫，尽管以前被认为主要是猫和狗的寄生虫，但在东南亚、澳大利亚和太平洋岛屿，尤其是所罗门群岛的人群中普遍存在[20]。另外，在柬埔寨进行的一项研究中，细胞色素氧化酶-1 基因的检测分离确定了两组锡兰钩口线虫(*A. ceylanicum*)，第一组仅限于人体感染，第二组则包括人和狗的分离株，因此证实了锡兰钩虫感染是真正的人畜共患病[21]。除药物治疗外，预防措施还包括个人卫生健康教育及穿鞋的必要性，避免土源性感染。钩虫疫苗已完成 1 期试验，并将进入儿童临床试验和最终功效研究[22]。美洲钩虫基因组的完整测序也为新药靶标和免疫调节蛋白的识别提供了希望[23]。

(四)传播和生活史(图 146-8)

虫卵随粪便排入环境，并孵化成杆状蚴，杆状蚴发育成熟为丝状蚴即可感染新的宿主。第三期幼虫或丝状蚴(感染期)可直接侵入皮肤，感染人体，10 天内迁移至肺部。十二指肠钩虫也可经口感染，在小肠前段直接成熟为成虫，但美洲钩虫必须经肺部迁移。3～5 周后，幼虫离开肺部，经过气管、咽，进入胃肠道，附着于肠黏膜并发育至成虫(表 146-1)。成虫黏附和释放抗凝血因子导致失血，且十二指肠钩虫造成的失血量更多。钩虫可在宿主体内存活数年。从幼虫钻入皮肤到产卵需 4～8 周。

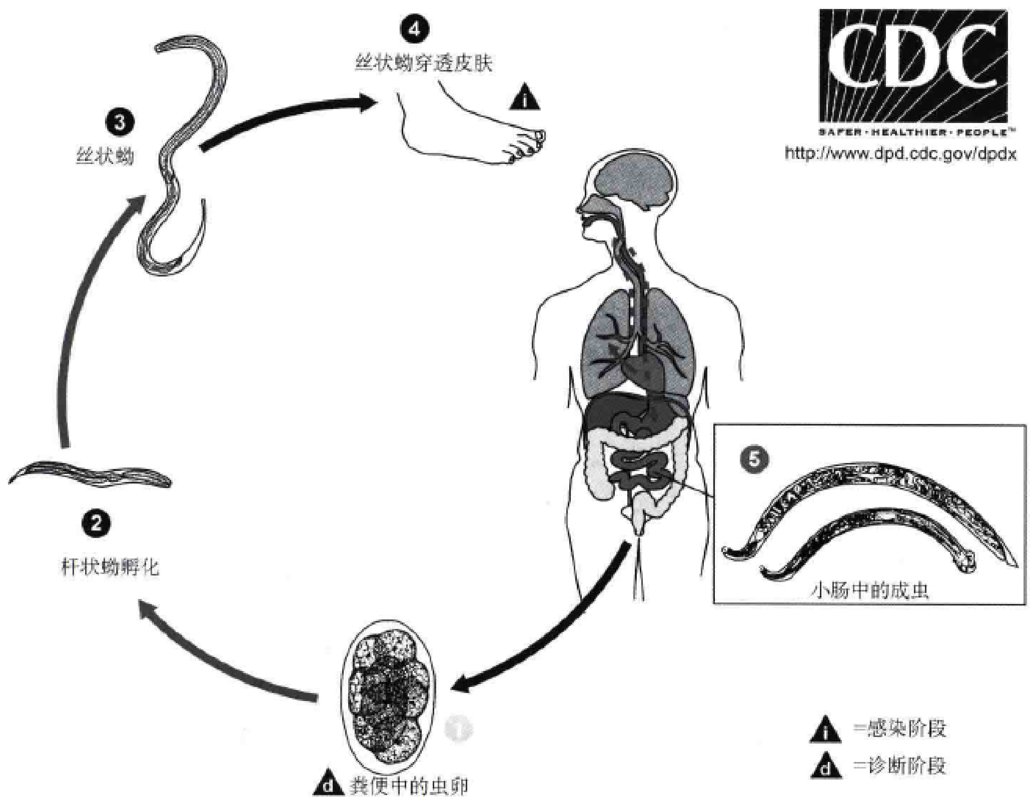


图 146-8 钩虫生活史

(五)临床表现

钩虫感染的主要临床症状为肠道失血和贮存铁消耗引起缺铁性贫血。钩虫引起的缺铁程度取决于感染程度、感染持续时间、钩虫种类和宿主体内铁贮存状况。据估计,一只十二指肠钩虫每天能吸出 0.2 ml 的血,而美洲钩虫每天的吸血量约为 0.05 ml。锡兰钩虫也有引起类似的空肠感染与相关贫血的记录。在其他病例中,感染局限于下消化道,其症状与犬钩虫感染更为相似[19]。儿童、育龄妇女和孕妇因为摄入的膳食铁不足和铁质储备减少,最容易患上缺铁性贫血。妊娠期贫血与产妇发病率和死亡率、泌乳障碍、早产和(或)低出生体重儿均相关。在儿童中,缺铁性贫血会引起神经认知发育受损、学习成绩下降和运动耐力差。

体内轻虫荷的患者一般无症状,中度和重度虫荷者则引起上腹部疼痛、压痛及腹泻。可引起蛋白质丢失性肠下垂和低蛋白血症。缺铁性贫血患者常见嗜睡和乏力,劳力性呼吸困难和心悸。儿童可引起慢性营养不良和生长发育受损。

在幼虫侵入部位常出现痒疹("钩虫痒病")。这必须与尾蚴皮炎和其他原因所致的蠕变疹区分开。有些患者,在幼虫通过肺部移动时表现为轻微的咳嗽和喘息。(有关钩虫临床意义的更多信息,请参见参考文献[14])

(六)诊断

1. 显微镜检查 钩虫感染的主要诊断是粪便中查到虫卵[7-8],需要连续数天多次采样。最佳方法是直接检查法和浓缩法,如福尔马林乙酸乙酯沉淀法。虫卵不被胆汁染色,常有 4~8 个细胞期胚胎(图 146-3a)。偶可见 16~32 个细胞期胚胎或发育期幼虫,尤其是在非固定粪便标本未及时检查时。钩虫卵可能会与毛圆线虫卵混淆,但毛圆线虫卵在卵裂晚期通常更大或更细长(图 146-3b)。

2. 培养 利用原田森喜朗法(Harada-Mori)进行检测粪类圆线虫幼虫的培养,亦可显示钩虫幼虫的存在(详情见下文"粪类圆线虫")(图 146-3c~g)。根据钩虫幼虫的形态特征,可以将其与粪类圆线虫幼虫进行区分(图 146-3c~g)。在充分固定的粪便标本中罕见幼虫,但偶尔会在咳出的痰中发现活的幼虫。

3. 宏观检验 成虫通常情况下紧紧地黏附在黏膜上,鲜有经粪便排出。肠镜或胃镜标本可检

查成虫，并通过成虫口囊结构进行鉴定。

当血清学检查显示缺铁性贫血时，曾经到过钩虫流行区者可以考虑为钩虫感染。

(七)治疗

治疗钩虫感染 2 种最实用和有效的药物是阿苯达唑和甲苯达唑，但不能用于妊娠早期孕妇或<12 个月的儿童。WHO 推荐可给妊娠中期、晚期和>12 个月儿童用药。噻吩嘧啶对钩虫感染也有效，且可在孕期使用(第 152 章)[1,14]。

缺铁者可补充铁剂。钩虫概述见表 146-2。

七、粪类圆线虫(*Strongyloides stercoralis*)

(一)分类

在现代生物物种分类中，该组中的生物位于线虫的第五进化枝色矛亚纲(Chromadoria)；小杆亚目(Rhabditina)；类圆线虫目(orderStrongylida)；类圆线虫科(family Strongylidae)。

类圆线虫属为不规则世代交替，寄生孤雌生殖与自生有性生殖世代交替，仅粪类圆线虫感染人。

(二)病原描述、传播和生活史(图 146-9)

1. 虫卵 寄生世代雌虫虫卵沉积于小肠黏膜处，常在到达肠腔前孵化，故鲜见随粪便排出(福氏类圆线虫(*Strongyloides fuelleborni*)，发现于赞比亚和津巴布韦共和国，以及在巴布亚岛新几内亚发现的一个相关的种，均为例外，见下文)。自由生活的雌虫卵为部分受孕，卵圆形，长 50～70 μm。

2. 幼虫 第一期杆状蚴(图 146-3c、d、f)，(180～380) μm×(14～20) μm，食管肌层组成身体的前1/3。短的口腔(图146-3d)和一个突出的生

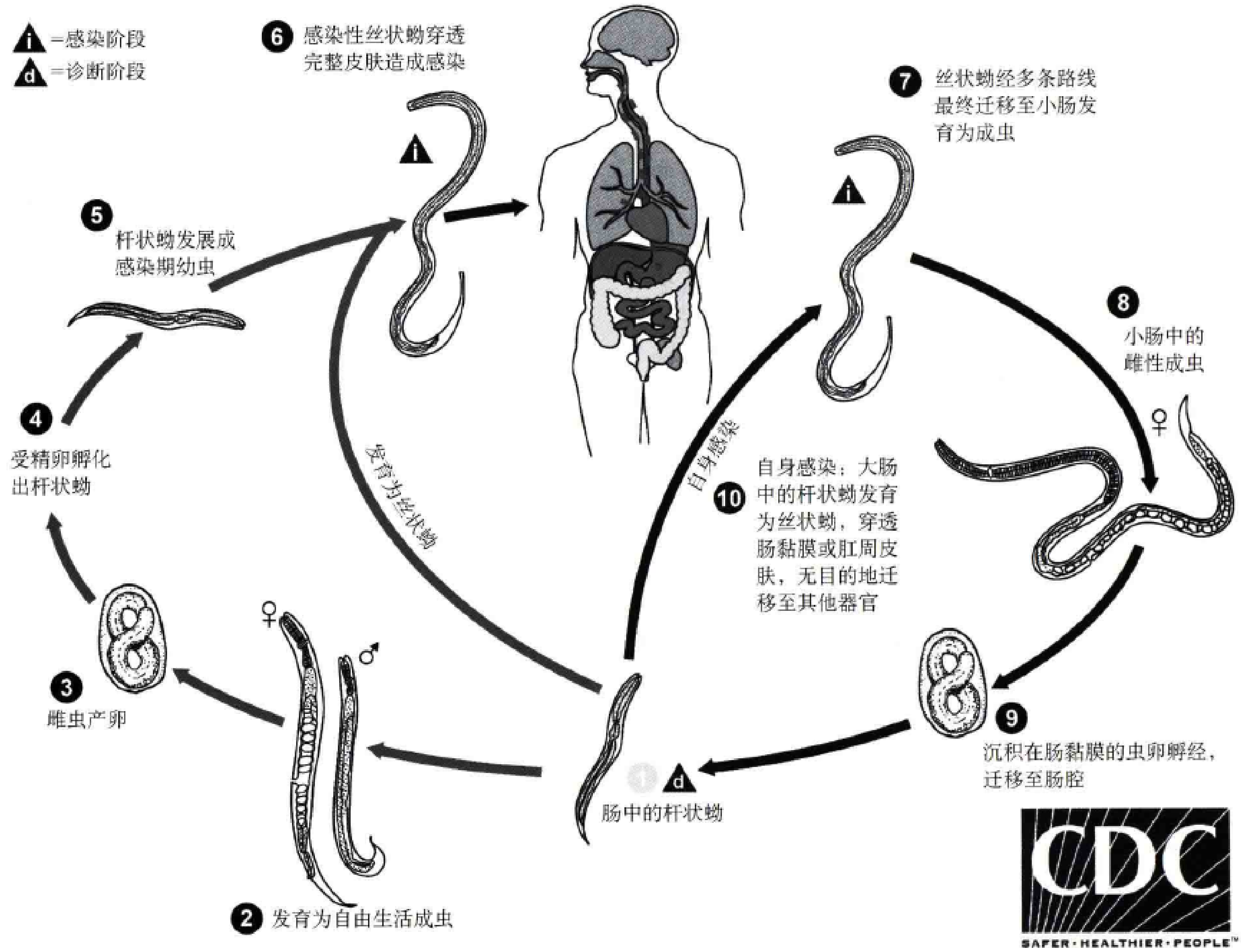


图 146-9 粪类圆线虫生活史

殖原基位于虫体中部（图 146-3c），有助于与其他线虫如钩虫（图 146-3e）进行鉴别。在土壤中，第一期幼虫生长遵循直接或间接的方式。在直接方式中，幼虫迅速发展成感染期幼虫，丝状蚴；间接方式中，第一期幼虫发展成自由生活的雌性成虫或雄性成虫。第三期幼虫（500～600）μm×16 μm，尾部有凹口，有助于与具有长而尖尾部的钩虫幼虫（图 146-3f～g）进行鉴别。

3. 成虫 不会出现雄性寄生虫，雌性寄生虫又细又小，身长（2～3）mm×（30～50）μm，前部比后部粗，包含食道。自由生活的雌性成虫大约只有寄生的雌性成虫的 1/2，虽然前者是后者的大约两倍粗细（约 80 μm），而生殖系统在形态上相似，但自由生活的雌性成虫的子宫中含有更多的卵。自由生活的雄性成虫比雌性成虫略小，大约 50 μm 粗细。

丝状蚴（感染期幼虫）钻入皮肤或黏膜，引起感染，进入静脉循环，随后到达肺部。幼虫穿透肺泡壁，迁移、通过支气管树，被吞咽，最终寄生于小肠上部黏膜，发育至成熟并开始产卵。虫卵孵化后即释放出杆状蚴，其中大部分随粪便排出（诊断期），在土壤中经多次蜕皮成为感染性丝状蚴（图 146-9）。

一些杆状蚴在肠腔发育至感染期丝状蚴，穿透肠黏膜或肛周皮肤，并在同一宿主内重复发育。自身感染导致的慢性感染可持续 40 年或以上。潜伏期（从幼虫钻入皮肤到产卵）为 2～4 周。

（三）流行病学和预防

粪类圆线虫与钩虫相似，生活在温暖潮湿的土壤中，广泛分布在热带和亚热带地区。据估计全球 3000 万至 1 亿人感染。对可用的有限患病率数据进行分析后，可以确定出类圆线虫感染的地理分布和危险因素。特别是已经确定了感染的热点，尤其是在东南亚[24]。但是，由于通常用于检测其他 STH 感染的常规方法敏感性低，因此实际患病率尚不确定。需要更敏感的方法，例如 Baermann 或琼脂培养法（APC）方法，以检测通常在慢性感染中排泄的少量幼虫[2,24]。流行病区人群，移民、难民及暴露在这些地区的战争退伍军人为高危人群。进行筛查和积极治疗的免疫抑制的患者应被纳入高危人群[8-10]。患有高感染综合征的患者也对直系亲属、实验室工作人员和提供护理的人员构成感染风险。

预防措施包括良好的个人卫生和在流行病区穿鞋。在柬埔寨北部进行的一项研究中，通过全基因组测序及核和线粒体 DNA 序列多态性分析比较了从狗和人中分离出的粪类圆线虫。这表明，类圆线虫种群在狗和人体内被发现，这增加了狗作为人畜共患类圆线虫病的传染源的可能性[25]。

（四）临床表现

粪类圆线虫感染一般为慢性感染，可持续数十年。大部分患者虫荷低，表现为无症状或间歇性皮肤和（或）胃肠道症状。主要的胃肠道症状为间歇性或慢性腹泻、腹痛、恶心和食欲缺乏。其他症状（如皮肤病和肺部症状）并不常见。

由于幼虫在皮肤内迁移（幼虫流），可能会出现复发性瘙痒、波纹、红斑性皮疹。最常见的部位是臀部、腹股沟和躯干；皮下浮动可持续 1～2 天。其他不太明显的荨麻疹和丘疹也会发生。尽管单一粪类圆线虫病肺部症状不常见，但幼虫经肺，可能与咳嗽、哮喘、呼吸困难及 X 线摄影肺部斑片状浸润有关[吕弗勒综合征（Loeffler-like syndrome）]。

一般在慢性感染中，免疫和感染水平之间存在着一种平衡。然而，当疾病或药物治疗导致免疫抑制时，这种平衡可能会丧失。在开始使用糖皮质激素治疗后仅 6 天即可出现症状加重。由此产生的弥散性虫体病或感染综合征具有极高的致死率。其他诱发这些综合征的情况包括化疗、感染 1 型 T 细胞淋巴病毒、酗酒、肾病、骨髓移植和低球蛋白血症[9,26]。

在播散性疾病中，幼虫向多个器官迁移，这可能与幼虫迁移过程中肠道携带的革兰阴性杆菌引起的菌血症甚至脑膜炎有关。过度感染是由蠕虫的增殖引起的，其扩散没有超出正常的迁移模式。粪便和痰中大量的幼虫（偶尔有胚胎蛋）产生严重的胃肠道和（或）呼吸道症状[27]。在肠道内，症状范围包括全身炎症、结肠炎、直肠炎和黏膜溃疡。大多数与实体器官移植相关的类圆线虫病病例是由于免疫抑制治疗导致受体潜伏感染的重新激活所致；然而，来自捐赠者的感染正变得越来越频繁。目前的实践指南需要更新，以纳入免疫学和分子技术，以便在移植前快速筛查虫体病，并考虑使用伊维菌素的经验治疗[28]。（更多关于粪类圆线虫的临床表现见参考文献[9]和[14]）。

(五)诊断

粪类圆线虫病的实验室诊断困难[17-18]。主要是通过粪便查幼虫，实时 PCR (real-time PCR, RT-PCR)检测 DNA，或血清查粪类圆线虫抗体选择可能基于不同临床环境下的实用性[29-30]。目前，血清学是最好的筛查方法，特别是在疾病不流行的地方。APC 和 RT-PCR 可作为选定病例的验证试验[31]。

1. 显微镜检查和培养 显微镜检查可检测第一期幼虫(杆状蚴)；很少检测到虫卵或成虫。由于幼虫排出较少，显微镜检查敏感性一般较低，幼虫数量取决于感染阶段和感染程度。因此，应进行数天多次样本采集检测。新鲜粪便培养是一种可选检测方法。理想情况下，应该是所有的疑似病例，尤其是流行病区患者样本，无须冷藏或添加防腐剂，直接送到实验室检查。培养方法的关键因素是可以处理大量粪便。与标准程序(如福尔马林乙酸乙酯浓度或 Kato-Katz 涂片)相比，它提高了敏感性。当幼虫发育至丝状蚴(感染期)时，能穿透完整的皮肤，故处理这些样品时要小心。可供使用的方法如下(详见参考文献[9][12]和[32])。①琼脂平板培养将 2～3 g 粪便放在琼脂平板中心，密封，室温孵育。如有幼虫存在，它们从粪便的细菌菌落中迁出，平板表面就出现特征性的正弦图案的细菌菌落(或偶尔在琼脂内)痕迹(图 146-3h)，随后显微镜检查确认幼虫。为安全起见，幼虫应放在含有福尔马林的溶液中收集以确认。这是目前推荐的最简单的培养方法。②原田森喜朗滤技术将粪便标本涂在滤纸上，浸在含有 3 ml 水的 15 ml 密封离心管中。将离心管置于 25℃的暗室中，7～10 天后，显微镜检查水中的幼虫。③皮氏培养皿法用滤纸或平皿存放标本，可见幼虫向光和新鲜水迁移。④贝尔曼技术将改进的漏斗上放一个铁丝网，盖上纱布，用水湿润的粪便标本置于纱布上。这种技术的原理是：幼虫主动从粪便向新鲜水和较高温度迁移。

有时，粪便在处理前，已经在高温环境中放置很久，钩虫幼虫也能孵化出。与粪类圆线虫相反，钩虫幼虫有很长的口腔和生殖原基(图 146-3c～e)。在咳出的痰或在行肠镜检查后的十二指肠抽吸物中可查见粪类圆线虫幼虫。粪类圆线虫丝状蚴可在高感染度的患者或经上述培养方法鉴定为感染的患者粪便或痰中查见。

值得注意的是，最近在澳大利亚发现了一例由自由生活的，中枢神经系统的破坏微线虫(*Halicephalobusgingivalis*)的杆状蚴引起的致命感染。最初的鉴别诊断包括弥漫性圆线虫病，但基于形态学评估和对生物体的分子鉴定，排除了圆线虫病[33]。

2. 核酸检测 已经开发了通过分子技术进行诊断的方法[7]，目前在许多参考实验室中都可以使用，但在撰写本文时尚无商业价值。各种检测粪便中 DNA 的方式，如 RT-PCR、环介导等温扩增技术(loop-mediated isothermal amplification, LAMP)和巢式 PCR，已被证明是有用的[34-36]。总体而言，特异性很高，但由于感染的不同阶段中粪便中幼虫数量少和间歇性排泄，其敏感性是可变的。比较不同检测方案的评价是可用的[30,32]。另一种可能的方法是检测尿中的寄生虫 DNA。这可能证明是一个优势，特别是在流行病区，收集和运输粪便可能是困难的，然而，这种方法的实用性、敏感性和特异性还有待证明。

3. 其他检测 虽然急性感染期常有嗜酸性粒细胞增多，但与粪类圆线虫感染之间的相关性并不确定。慢性感染期可能是间歇性的。使用激素可明显降低粪类圆线虫感染者血液中的嗜酸性粒细胞。

4. 血清学试验 血中查抗粪类圆线虫抗体可作为粪类圆线虫筛查或辅助诊断。抗体水平在 6～12 个月有效治疗后下降[38]，12～24 个月可能呈阴性[39]。商业化酶免疫分析法(EIA)[粪类圆线虫 IgG 酶联免疫吸附检测法(EIA-4208)，DRG，斯普林菲尔德，新泽西]的敏感性，粪类圆线虫丝状抗原为 90%，远高于间接血凝试验和间接荧光抗体试验。据报道美国疾病预防控制中心使用更敏感的(约 95%)粪类圆线虫酶联免疫法检测[38]。但严重免疫功能低下者的敏感性可能会降低。酶免法的特异性为 85%，可能与丝虫和其他线虫发生交叉反应。如果抗体阳性，应用病原学诊断(显微镜或培养)，并排除可能产生抗体交叉反应的其他寄生虫的感染。对所有进行免疫抑制治疗的患者应进行粪类圆线虫血清学检查(如器官移植或恶性肿瘤治疗者等)。评估血清学方法的准确性和敏感性是困难的，因为缺乏敏感性的粪便为基础的参考标准(金标准)。然而，在过去

的几年中，基于一种新的重组抗原的测试已经被开发出来，并且据报道具有更高的特异性。其中一种检测方法是SS-NIE-1 IgG_4 ELISA，它使用的抗原是NIE，这是一种31 kDa的重组抗原，来自美国国立卫生研究院(National Institutes of Health，NIH)开发的粪类圆线虫L3 cDNA文库。该方法的敏感性和特异性分别为93%和95%[40]，与其他寄生虫感染的交叉反应较少。一种新的检测方法，荧光素酶免疫沉淀系统，被认为比EIA系统的效果更好[41]。该试验也被证明在偏远地区采集的血点上效果良好，因为采集和运输血清可能是一个问题[42]。在撰写本文时，这些使用NIE抗原的新检测方法还没有商业化。

(六)治疗

粪类圆线虫感染治疗的重要性在于可能会发生严重的并发症。伊维菌素为首选药物，但是免疫功能低下者需要反复治疗。伊维菌素不应用于孕妇或体重<15 kg的儿童。阿苯达唑和甲苯达唑比伊维菌素效果稍差(尽管噻苯咪唑很有效，但因频繁产生严重不良反应不再使用(第152章)[1,14]。这些药物不能用于妊娠早期或年龄<12个月的儿童，WHO推荐妊娠中期、晚期和年龄>12个月的儿童使用。在感染根除之前，建议使用血清学、粪便显微镜检查(如果阳性)和嗜酸性粒细胞计数进行监测(通常在治疗后6～12个月)。来自疟疾流行国家的难民和移民可获得指导方针[4]。

粪类圆线虫的概述见表146-2。

八、福氏类圆线虫(*Strongyloides fuelleborni*)

福氏类圆线虫是非人灵长类寄生虫，在非洲中部和东部的猴子中发现。巴布亚新几内亚发现了一个类似的种，但未确定动物媒介。大部分成年人感染无症状，但婴儿可能引起蛋白质丢失性肠下垂和腹胀("腹部肿胀综合征")。与粪类圆线虫相比，粪便中发现大量福氏类圆线虫的虫卵，与钩虫相似。这2种类圆线虫可从成虫形态学进行鉴别[43]。治疗方法与粪类圆线虫相似，如果感染后不治疗，婴儿的死亡率非常高。

九、毛首鞭形线虫(*Trichuris trichiura*)

(一)分类

在现代生物物种分类中，该组中的生物位于线虫的第1进化枝矛线亚纲(Dorylaimia)：毛首目(Trichocephalida)鞭毛科(family Trichuridae)。

(二)病原描述

1. 虫卵 鞭虫卵(图146-2f)，外形似柠檬，两端各有一个黏液性盖塞和一个未分裂核。虫卵有双层外壳，外层胆汁可染色；(50～55)μm×(20～24)μm。在有利土壤条件下，虫卵完全发育成含感染性蚴卵需2～4周。

2. 幼虫 幼虫寄生于小肠[第二期幼虫(260×15)μm]。生长一段时间之后进入盲肠，并嵌入肠黏膜。

3. 成虫 鞭形虫的名字即源于成虫形态，因此最具特点。细长的前段钻入肠壁黏膜，包含生殖系统较粗的后端延伸到肠腔内。虫体白色，雄性(30～45 mm)比雌性短(35～50 mm)，且后端卷曲。每条雌性成虫每天产卵约20 000个，在人体内一般可存活3年。

(三)流行病学和预防

鞭虫呈世界性分布，在热带和亚热带地区，儿童鞭虫感染经常与蛔虫和钩虫有关。预防措施包括个人卫生健康教育，避免土壤污染，以及在流行病区进行药物治疗。

(四)传播和生活史(图146-10)

传播方式为经口传播，直接摄入污染的土壤中的胚胎虫卵(感染期)。摄入后，幼虫被释放并进入大肠，并在大肠的黏膜隐窝发育成成虫。经粪便排出的虫卵(诊断阶段)包含有未分裂的卵细胞，虫卵一旦在温暖潮湿的土壤中，2～4周即具有感染性(表146-1)。

潜伏期(从摄入虫卵到产卵)约3个月。

(五)临床表现

临床症状与感染程度有关；轻度感染为无症状或呈现轻度胃肠道症状。

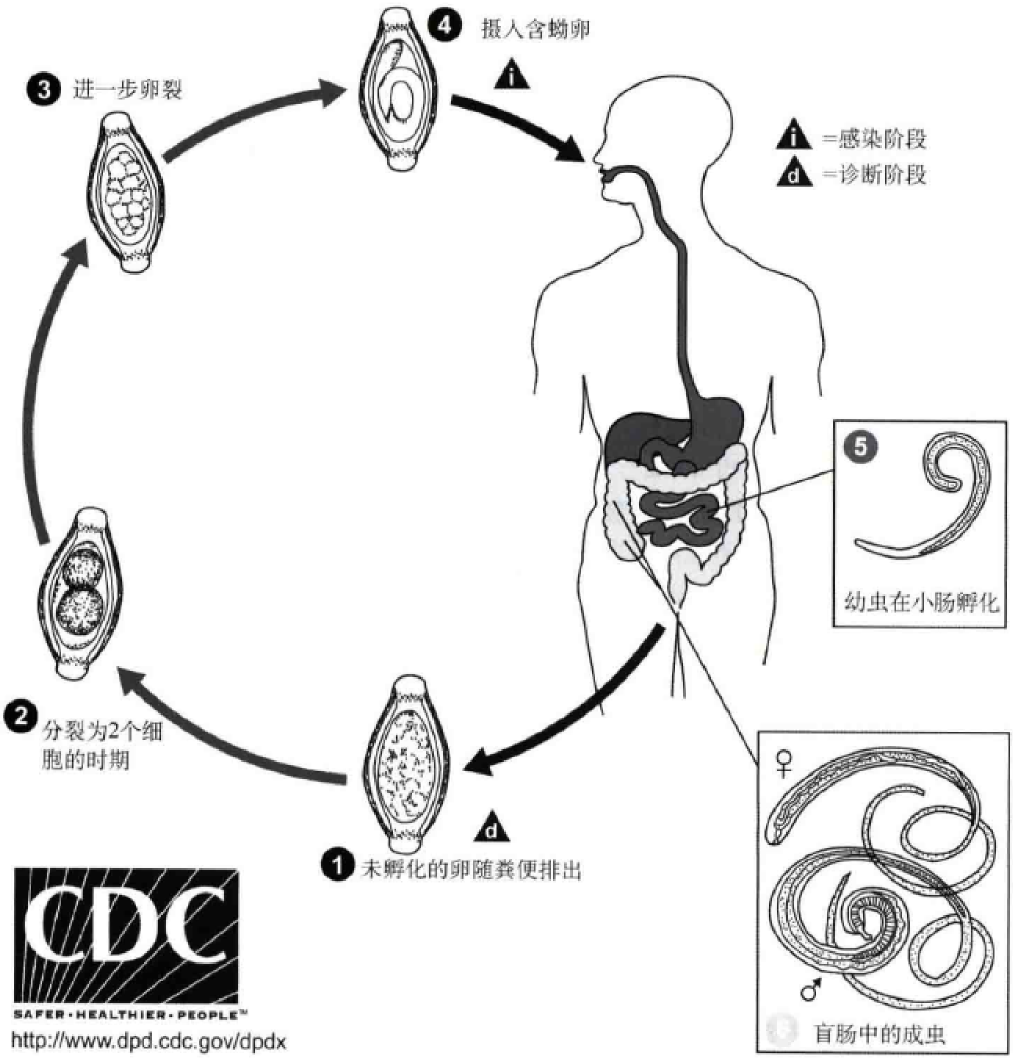


图 146-10 鞭虫生活史

严重感染可表现胃痛、呕吐、腹胀、厌食、体重减轻及鞭虫痢疾综合征，极端情况下会并发直肠脱垂。严重感染的儿童可能因慢性营养不良和贫血导致发育迟缓。缺铁性贫血也可能发生在虫荷较高的孕妇中，特别是当同时感染钩虫时[44]。滴虫感染引起贫血的机制包括成年蠕虫对肠道上皮细胞的损伤导致的失血和由感染引起的食欲下降导致的食物（和铁）摄入量减少。随着虫荷的增加，鞭虫对健康的影响也随之增加，进而导致慢性营养不良（更多鞭虫的临床表现见参考文献[14]）。

（六）诊断

1. 显微镜检查 鞭虫感染的主要诊断是在粪便中检获虫卵。需要在数天内多次采样。浓集法，如福尔马林醋酸乙酯沉淀法，为最佳方法。虫卵黄染、壳双层，两端各有一个透明栓，外观呈特征性的茶盘形（图 146-2f）。

2. 宏观检验 成虫极少经粪便排出，偶尔在结肠镜检查时发现[45]。前端卷曲、细长，尾厚，呈鞭形（故名鞭虫）。组织切片中可见典型虫卵（图 146-4b）。

阿苯达唑和甲苯达唑为首选药物（第 152 章）[1,14]。药效不佳情况多见，需连续给药。联合用药的疗效最高，如阿苯达唑联合酚嘧啶[46]。这些药物不能用于妊娠早期或年龄＜12 个月的儿童。WHO 推荐在妊娠中期和妊娠晚期及＞12 个月的儿童使用。

鞭虫概述见表 146-2。

十、结果的评价、解释和报告

应记录送检标本的容量和质量，如果标本不合格，需在报告中注明。

粪便中发现任何蠕虫卵或幼虫都有意义，即使患者没有临床症状，也需要治疗。无须进行虫体定量，因这并不一定与临床疾病有联系。然而，在极少情况下，有必要对儿童进行流行病学研究或临床评估。

标本采集时间也非常重要，尤其是怀疑蛲虫感染时。如果标本不合适，如延迟、干燥和不足，需重复采样。如条件允许，应采集新鲜样本和(或)使用防腐剂。确保标本适合检测的说明和操作如下。①粪类圆线虫幼虫未检出，一个阴性结果不能排除类圆线虫感染。请立即采集新鲜标本及时送到实验室检查。②透明胶带法未检出蛲虫卵，一个阴性结果并不能排除蛲虫感染。如有临床表现，应重复正确采集标本。如有需要可联系实验室。③未检出寄生虫，线虫的排泄物是不定的或者间歇性。如有临床表现，应重复检测。如有需要，请联系实验室。

参考文献请扫二维码查阅

第147章 丝 虫

CARMELLE T. NORICE-TRA, THOMAS B. NUTMAN

（贯伟 译；陈家旭 审校）

丝虫是节肢动物传播的皮下和淋巴组织寄生线虫。感染人的丝虫有8种，但引起病理变化的主要有4种：班氏吴策线虫(*Wuchereria bancrofti*)、马来布鲁线虫(*Brugia malayi*)、旋盘尾线虫(*Onchocerca volvulus*)、罗阿罗阿丝虫(*Loa loa*)。其分类采用新的分子方法(表135-5)[1]。一般来说，丝虫是经节肢动物叮咬传播。虽然这些寄生虫在温带或亚热带地区是不流行，但它们常常出现在移民、居住或到丝虫病流行的热带地区旅行的个体中。除非接触到具有传染性的幼虫，否则一般不会发生感染。表147-1所示为所有人体丝虫的分布及其传播媒介。

丝虫生活史复杂，包括昆虫体内的感染期幼虫和人体内的成虫阶段，在人体内寄生于淋巴结、及其邻近淋巴管或皮下组织。在脊椎动物体内从感染期幼虫发育到妊娠期的成虫阶段需要经历数月或1年，甚至更长时间。雌虫产出微丝蚴，在血液中循环或移行至皮肤，之后通过适宜的媒介节肢动物叮咬吸入体内，发育成具有感染性的幼虫，开始新一轮的生活史。班氏丝虫、马来丝虫和罗阿罗阿丝虫在血液中循环呈现出典型的昼夜节律或“周期性”，可以是夜现周期性(典型的是淋巴丝虫)或昼现周期性(罗阿罗阿丝虫)。其他丝虫没有周期性，在昼夜任何时间都能在外周血中检出。如果外周血中没有微丝蚴，则可能存在于深部的内脏毛细血管中，特别是肺部毛细血管。因为成虫通常隔离在组织中，所以依靠在血液或皮肤(取决于不同种类)中查找微丝蚴来对感染进行诊断。成虫可以存活数十年[1]，而微丝蚴的寿命只有3个月到3年。

微丝蚴的组织和结构相对简单(图147-1)。虫体呈蠕虫状，染色后可见虫体内沿长径间隔排列的体核，中间分布有器官或细胞器前体细胞组成的特殊细胞。有些种类的微丝蚴折叠在鞘膜中，有些种类则没有鞘膜(表147-1，图147-2)。

在疫区的本地感染者与到疫区旅行或近期移居而感染的患者之间，临床表现显著不同，至少获得感染的周期是不同的。最典型的情况是，未曾暴露过的感染个体临床症状明显，而相比之下，疫区本地感染的个体却通常是无症状感染者[3-4]，此外，症状往往发展缓慢。

一、淋巴丝虫(*lymphatic Filarial parasites*)

(一)分类

班氏丝虫、马来丝虫和帝汶丝虫属线虫纲第三进化枝(色矛亚纲 Chromadoria：旋尾亚目 Spirurina)的旋尾总科、盘尾科。

(二)病原描述

有3种寄生于人淋巴系统的丝虫——班氏丝虫、马来丝虫和帝汶丝虫。成虫寄生于输入淋巴管或淋巴结中。它们可在人体宿主内存活数十年。其形态学和其他特征见表147-1和图147-1、图147-2。

(三)流行病学和传播

1. 班氏丝虫 班氏丝虫是最常见和分布最广泛的感染人的丝虫。广泛分布在热带和亚热带地区，包括亚洲和太平洋海岛、非洲、南美洲部分地区和加勒比海地区。人类是该寄生虫的唯一终宿主和天然的传染源。班氏丝虫既以周期的形式，也以亚周期的形式存在。夜现周期型在夜间(晚10时至凌晨4时)外周血中出现微丝蚴，而亚周期

表 147-1 人体寄生丝虫

虫种	地理分布	媒介	主要病理表现	寄生部位	周期性	大小(μm)	尾部特征	鞘膜	
								有无	染色特点
班氏吴策线虫(*Wuchereriabancrofti*)	热带地区	蚊	淋巴结炎,肺部	血液,鞘膜积液	夜现性,亚周期型	298×(7.5～10)	尾部尖,无尾核	+	不能染色
帝汶布鲁线虫(*Brugiatimori*)	印尼	蚊	淋巴结炎	血液	夜现性	300×(5～6)	有尾核	+	易于染色
马来布鲁线虫(*Brugia malayi*)	东南亚	蚊	淋巴结炎,肺部	血液	夜现性,亚周期型	270×(5～6)	有尾核	+	吉姆萨染色后显亮粉色
旋盘尾线虫(*Onchocerca volvulus*)	非洲,南美	蚋	皮下结节,眼,淋巴结炎	皮下组织	无	309×(5～9)	无尾核	—	
链尾曼森线虫(Mansonellastreptocerca)	非洲	库蠓	皮下结节	皮下组织	无	210×(5～6)	尾部弯曲,核分布其中	—	
罗阿罗阿丝虫(*Loa loa*)	非洲	斑虻	过敏反应	血液	日现性	最大 300	核不均匀的分布至尾尖部	+	不能染色
常现曼森线虫(*Mansonella perstans*)	非洲,南美	库蠓	可能有过敏反应	血液	无	203×(4～5)	尾部钝圆,核分布其中	—	
奥氏曼森线虫(*Mansonellaozzardi*)	中美,南美	库蠓蚋	不明确	血液	无	224×(4～5)	尾部长,无核	—	



图 147-1 人体微丝蚴，苏木素染色（放大倍数，×325）

注：a. 班氏丝虫；b. 马来丝虫；c. 罗阿罗阿丝虫；d. 旋盘尾丝虫；e. 常现曼森线虫；f. 奥氏曼森线虫，见彩插

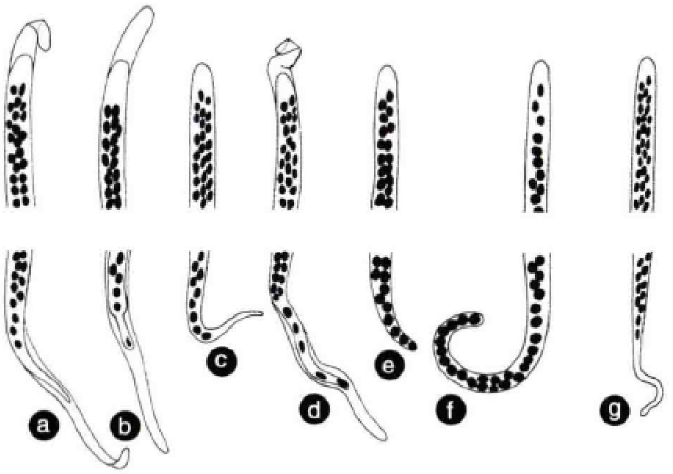


图 147-2 人体微丝蚴虫体前后端示意图
注:a. 班氏丝虫;b. 马来丝虫;c. 盘尾丝虫;d. 罗阿罗阿丝虫;e. 常现丝虫;f. 链尾丝虫;g. 奥氏丝虫

型在所有时间段的外周血中都出现微丝蚴,以下午水平最高。通常,亚周期型只存在于太平洋岛屿地区[包括库克群岛、图瓦卢(原名埃利斯群岛)、斐济、新喀里多尼亚、马克萨斯、萨摩亚和社会群岛]。在其他地方,班氏丝虫呈夜现周期性。其天然媒介在城市地区为致倦库蚊,在农村地区为按蚊或伊蚊。

2. 马来丝虫和帝汶丝虫 布鲁丝虫病主要分布在中国、印度、印度尼西亚、韩国、日本、马来西亚和菲律宾。帝汶丝虫仅在帝汶的两个岛屿有出现。与班氏丝虫的相似,布鲁丝虫病也有周期型和亚周期型 2 种形式。夜现周期型较为常见,主要在沿海稻田地区传播(媒介是曼蚊或按蚊);而亚周期型主要在湿地森林地区传播(媒介是曼蚊)。虽然人类是常见宿主,马来丝虫也可以在自然状态下感染猫。

(四)临床表现

淋巴丝虫病(LF)临床表现多样。最常见的临床表现分别是无症状(或亚临床)微丝蚴血症、淋巴水肿、鞘膜积液和急性休克、皮肤淋巴管腺炎和象皮肿。此外,淋巴丝虫病还可以表现出乳糜尿和热带嗜酸性粒细胞增多症[5-7]。临床表现与地理分布和导致感染的丝虫种类有一定关联[8]。此外,与流行区本地病例相比,非流行区的病例发病通常更为迅速,临床表现也更为严重[3-4]。除非在外周血检查中偶尔发现微丝蚴血症,无症状感染(亚临床)微丝蚴血症很少引起医务人员的重视。虽然可能不表现出临床症状,但实际上所有班氏丝虫或马来丝虫微丝蚴血症患者都有一定程度的亚临床疾病,如通过淋巴显像观察到膨大扭曲的淋巴管[9]和男性班氏丝虫感染者通过超声检测到的阴囊淋巴管扩张[10]。除了这些表现,大部分个体多年都无临床症状。无论急性或慢性感染都较少发生进展[11]。只有在感染后较长时间才有可能发展为淋巴水肿。成年丝虫和宿主免疫反应的相互作用在几乎所有感染者中引起淋巴功能障碍。这个过程不断进展,并且一旦建立便持续存在[12]。淋巴水肿最常见的部位是下肢,也可波及上肢、乳房和阴囊。还可见皮下组织增厚、角化过度、皮肤裂隙和皮肤增生等继发症状。在慢性皮肤改变和淋巴功能紊乱基础上的复发感染[以水肿性炎症斑块和全身症状(发热、寒战、肌痛、头痛)为特征的急性皮肤和淋巴组织腺炎(ADLA)],是发展为淋巴水肿进而成为象皮肿的主要原因[13-14]。

淋巴丝虫病急性发作包括多种与炎症相关的临床过程。真性丝虫性淋巴管炎(ADL),认为是反映了成虫的死亡,表现为炎症、肿胀和从丝虫可能寄生灶点向周边延伸的逆行性淋巴管炎。局部淋巴结肿大,整个淋巴管硬化红肿。另一种急性发作目前被称为细菌性 ADL 或皮肤淋巴炎(DLA)。皮肤组织改变导致损伤,尤其是足趾部位,促进皮肤细菌菌群侵入[15-16]。由于这些原因,四肢成为最容易反复发生细菌感染的部位[17-18]。DLA 的临床表现与 ADL 明显不同[17]。淋巴管炎呈现网状而不是线形,局部和全身症状常更加严重,包括水肿、疼痛、发热和寒战等[19]。这就导致了严重的急性发病及淋巴水肿进而发展为象皮肿[20]。班氏丝虫和马来丝虫引起的 ADL 和 DLA 均可发生在上肢和下肢,但只有班氏丝虫感染才会波及生殖器淋巴管。

班氏丝虫病成虫堵塞腹膜后和膈下淋巴管造成鞘膜积液,男性可在单侧或双侧的鞘膜脏层和壁层之间出现乳白色淋巴液累积。具体表现为睾丸触诊边界不清的半透明包块,有别于先天性阴囊积液或疝,后者是由于被膜顶部闭锁,腹水不能流动。如果腹膜后淋巴管堵塞,肾淋巴管压力增加致其破裂入骨盆或肾小管,形成乳糜尿。乳糜尿的特点是间歇性出现,通常在患者晨尿中发现。女性有外阴淋巴肿的报道(也称外阴象皮肿)[21-22]。

热带肺嗜酸性粒细胞增多症(TPE)是一种由肺内LF微丝蚴的免疫高反应性引起的综合征[5,7,23]。该综合征发病男性多于女性,最常发生在20～30岁。绝大部分病例来自印度、巴基斯坦、斯里兰卡、巴西、圭亚那和东南亚国家,但丝虫感染可发生在任何地区。主要特征包括丝虫病流行区居住史、夜间阵发性咳嗽和哮喘、体重减轻、低热、淋巴结肿大、血中嗜酸性粒细胞显著增多(≥3000个/μl)。很少在患者血中发现微丝蚴,丝虫抗原可能无法检测到。胸部X线片通常表现为肺区中下部肺纹理增多和弥漫性粟粒样损伤或磨玻璃样改变,但也有20%～30%表现为正常[24]。肺功能检查,大部分病例表现出限制性异常,半数病例有阻塞性病变,总血清IgE水平(10 000～100 000 ng/ml)和抗丝虫抗体明显升高。虽然尚无独立的临床或实验室标准将TPE和其他肺部疾病区分,居住在热带地区,抗丝虫抗体滴度高,以及对乙胺嗪快速的临床反应有助于热带嗜酸性粒细胞增多症的诊断[25]。

(五)诊断

班氏丝虫和马来丝虫感染可以通过临床表现、流行病学史、超声及实验室诊断等进行无创诊断。采集适宜的血液或组织样本进行微丝蚴的显微检查、循环抗原检测或丝虫DNA的核酸扩增试验(NAAT),可以对寄生虫进行最终鉴定。采血时间至关重要,应该根据当地流行的微丝蚴周期性特点确定(表147-1)。免疫学诊断和分子生物学技术的新进展为诊断提供了多种选择。

1. 超声 超声检查可显示淋巴通道中的成虫或因感染而扩张的淋巴管[26]。在疑似班氏丝虫引起的淋巴丝虫病例中,男性阴囊和女性胸部的高频率超声结合多普勒显像可以识别扩大淋巴管中运动的成虫("丝虫舞蹈症")[27-28]。80%的男性班氏丝虫微丝蚴感染者可以在精索淋巴管中直观地观察到成虫[11]。在马来丝虫病中,超声可用于定位女性乳房、腹股沟淋巴结、大腿小腿淋巴管中的成虫[29]。

2. 直接检测 虫体可在血液或其他体液(淋巴液、尿、阴囊积液)直接查见,检查时需参考其不同虫体的周期性及形态学特征(表147-1和图147-2)。

(1)显微镜检查:将少量液体样本滴在洁净的玻片上推开,自然风干,吉姆萨染色后进行显微镜检查。班氏丝虫的微丝蚴有鞘膜,在染色涂片中呈平滑卷曲状,298 μm×(7.5～10.0)μm。体核分散,头间隙短,尾尖无核(图147-1a)。马来丝虫的微丝蚴与班氏丝虫微丝蚴形态相似,都有鞘膜结构,但马来丝虫微丝蚴通常更小[279 μm×(5～6)μm],且可通过其尾核进行区分(图147-1a,b)。帝汶丝虫微丝蚴与马来丝虫微丝蚴也近似,有明显的尾核,但帝汶丝虫微丝蚴较大(长可超过300 μm)。此外马来丝虫的鞘膜结构在吉姆萨染色下呈明亮的粉红色,而帝汶丝虫和班氏丝虫的鞘膜结构在吉姆萨染色下不着色。

由于微丝蚴可能在血液中少量存在,一些敏感性较高的实验,如微核孔过滤技术及Knott浓集技术也常用于感染的诊断。

(2)微核孔过滤:已知量的抗凝血经3 μm聚碳酸酯(微核孔)滤膜滤过。用大量蒸馏水(50 ml)洗脱(水溶解红细胞,使虫体完整的暴露,便于观察)。继而干燥滤膜,用瑞氏染色或吉姆萨染色,显微镜下镜检。现场研究时,可在9 ml 2%的福尔马林或10%Teepol溶液中加入1ml抗凝血,保存9个月以备检测[30]。

(3)Knott浓集技术:在9 ml 2%的福尔马林中加入抗凝血(1 ml),1500 rpm离心1 min。取出沉积物涂片并干燥,用瑞氏染色或吉姆萨染色,显微镜下镜检。

(4)抗原检测:斑氏丝虫循环抗原检测为微丝蚴血症及隐匿感染的诊断提供了可能。目前,市面上有2种检测全血、血浆或血清的方法(美国尚无):①CelllabS(汤斯维尔,昆士兰澳大利亚;tropbio@jcu.edu.au)提供的Tropbio丝虫病抗原Ⅱ酶联免疫吸附检测试剂盒(ELISA);②BinaxNOW Filariasis,由Alere International(Waltham, MA)提供的快速免疫层析试条;③Alere Filariasis Test Strip,同样是由Alere International提供的快速免疫层析检测法。Alere丝虫病测试条可以检测到的丝虫抗原浓度低于BinaxNOW丝虫病试纸条[31-32]。以上几种方法敏感性均可达96%～100%,特异性达98%[32-33]。这些检测方法均可用于白天或夜间任何时段的取血,无须根据微丝蚴活动周期性限定取血时间。FDA尚未对上述检测试剂核准。目前,尚无针对马来丝虫病的循环抗原检测。

(5)核酸检测技术：在某些合适的实验室，NAAT可用于检测虫体DNA，已成为目前最灵敏的确诊方法[34-36]。对各淋巴组织虫体均有相应的引物和探针，其特异度可达100%，敏感性比直接病原学检查高10倍。最近的诊断研究进展包括高敏感性的实时NAAT检测，可检测少量低拷贝的干燥人血样本中重复目的序列 *HhaI*[37-39]；环介导等温技术，简便、特异性高的快速检测方式[40]。目前这些测定方法尚未商业化。

3. 血清学试验 抗布鲁线虫虫体粗抗原检测IgG或IgG_4特异性较差，与包括肠道线虫在内的其他蠕虫的抗原叉反应广泛。此外，血清学试验不能区分现症感染与既往感染。不过该检测方法对诊断仍有一定意义，其阴性结果可以排除现症或既往感染。该检测已商业化，在美国国立卫生研究院，美国疾病预防控制中心及世界卫生组织(WHO)全球淋巴丝虫病合作中心均可进行。

一种被称为Wb123的抗原已被使用于流行病学研究，特别是在班氏丝虫感染的血清学试验方面。目前有2种尚未面世的检测方法：一种是InBios公司(西雅图，华盛顿州)的检测丝虫IgG_4抗体的ELISA试剂，另一种是SD Bioline试剂盒，来自Standard Diagnostics(韩国首尔)的丝虫病IgG_4快速诊断试验(RDT)，用于检测该抗原的IgG_4抗体。这些试验的敏感性为70%～80%，特异性大于97%[41-43]。

对于布鲁线虫病，可以使用针对重组的马来丝虫BmR1的IgG_4免疫反应的Brugia Rapid试验(Reszon Diagnostics International，Subang Java，雪兰莪，马来西亚)。对该测试性能的大型多中心评估显示出92.96%的敏感性和100%的特异性[44-45]。

(六)治疗与预防

目前，LF药物治疗方法可选乙胺嗪疗法、伊维菌素及阿苯达唑治疗。尽管阿苯达唑对微丝蚴有一定的效果，乙胺嗪仍是活动性淋巴丝虫病患者(微丝蚴血症、特异性抗原阳性或超声查见成虫)的治疗选择。如果成虫仍存在，治疗后数月内就可能伴随微丝蚴血症发生。长期低剂量乙胺嗪治疗也有疗效(如使用乙胺嗪盐)。有证据显示联合用药有助于增强其疗效[46-49]。目前全球消除行动将这3种药物以不同方式组合用于流行区人群的联合治疗[50]。除罗阿罗阿丝虫外，大部分丝虫都有内共生菌。这些沃尔巴克菌对于丝虫幼虫的发育和成虫的生存繁殖都起着至关重要的作用。新研究显示，针对沃尔巴克菌的抗生素疗法(如四环素类)有助于降低微丝蚴水平[51]和血液中的微丝蚴抗原[52]。

非活动性感染的患者一旦发生淋巴水肿，抗丝虫药治疗也不再有效。对淋巴水肿的治疗应着重于锻炼、站立、局部皮肤护理及对侵入式皮损的治疗[51]。近期也有部分证据显示，淋巴水肿早期使用多西环素，除了有抗菌作用，也可能阻止病变恶化[53]。对于细菌性急性皮肤和淋巴组织炎的治疗，抗丝虫药物的疗效未被证明，目前仍以皮肤护理和抗生素治疗为主[15,19]。鞘膜水肿可通过反复抽液或手术缓解[54-56]。

流行区居民，难以避免受到蚊虫叮咬，对外来者应该采用蚊虫驱避剂及蚊帐防护。用药浸蚊帐有一定的防护效果。社区干预是目前消除淋巴丝虫病的公共卫生问题的举措[57-58]。这一行动原则在于每年大规模用抗丝虫药[阿苯达唑与乙胺嗪(除与盘尾丝虫病合并流行的地区外)或伊维菌素联合治疗]抑制微丝蚴血症。如果能持续抑制，就能达到传播阻断的作用。社区健康教育及对慢性淋巴丝虫病患者的后遗症临床护理也是丝虫病控制与消除计划的重要组成部分[59]。目前尚无可用的疫苗，但未来可能发挥作用。

二、旋盘尾线虫(*Onchocerca volvulus*)

(一)分类

旋盘尾线虫属于线虫纲第三进化枝(色矛亚纲 Chromadoria；旋尾亚目 Spururina)的旋尾总科、盘尾科。

(二)病原描述

旋盘尾丝虫成虫主要寄生在宿主组织的纤维结节内。成虫在宿主体内可存活数年。微丝蚴及成虫的形态学及其他特征见表147-1，图147-1和图147-2。

(三)流行病学和传播

盘尾丝虫病，又称"河盲症"，是由旋盘尾线虫

感染引发的皮下寄生丝虫病。近1.8千万人受到感染，主要分布于赤道附近的非洲、撒哈拉地区、也门及巴西和委内瑞拉的部分地区。

(四)临床表现

盘尾丝虫病的临床表现主要局限于皮肤、淋巴结与眼部，且会逐渐加重。重度感染往往见于反复接受感染性幼虫的感染，可导致最严重的并发症。

1. 皮肤 盘尾丝虫性皮肤病可能表现为急性丘疹性皮炎、慢性丘疹性皮炎、苔藓样化性皮炎、皮肤萎缩和腹股沟及色素沉着[60-62]。瘙痒是盘尾皮炎的最常见表现，可伴局部水肿和红斑。通常，皮肤病表现为丘疹性、瘙痒性皮炎。如果感染持续时间长，则可能发生苔藓样变和色素改变（色素沉着或色素沉着过多）；这些疾病通常会导致萎缩、"蜥蜴皮"和皮肤斑点。局部性高反应性皮肤炎（一种称为" sowda"的皮肤病）是一种以强烈瘙痒和色素沉着为特征的苔藓样皮炎[63-67]。

2. 盘尾丝虫性结节 盘尾丝虫性结节是肉眼可见的皮下结节，其中包裹有成虫。在非洲患者中，结节好发于骨骼突出位置；拉丁美洲的患者中，结节好发于肢体上端，尤其是头部。结节大小不一，典型表现为硬质的无触痛结节。据估计，每个可触及的结节处可有4个深部难触及的结节[68-69]。

3. 淋巴结节 淋巴结肿大症状很常见，尤其在腹股沟及股骨区域。病理学包括淋巴结附近区域瘢痕形成（非洲地区的旋盘尾丝虫感染）或滤泡增生（也门的旋盘尾丝虫感染）。随着淋巴结的增大，可逐渐在松弛的皮肤内下坠（俗称"悬垂性腹股沟"），继而出现腹股沟及大腿疝。

4. 眼病 盘尾丝虫性眼病通常见于中度或重度感染者，不累及眼睛，可能表现为结膜炎、前葡萄膜炎或虹膜睫状体炎，导致继发性青光眼、硬化性角膜炎、视神经萎缩和脉络膜视网膜病变[70-71]。最终，在一小部分盘尾丝虫病患者中观察到严重的视力丧失或失明后果。

5. 其他并发症 慢性感染与低体重和弥漫性肌肉骨骼疼痛有关。病变累及垂体，可引起一种称为 Nakalanga 综合征的后天性侏儒症，其特征为生长迟缓、内分泌功能障碍、精神障碍和癫痫[72-73]。相关的癫痫病也有报道[72,74-75]。其他情况是生殖异常、继发性闭经、自然流产和不育。

(五)诊断

确诊依据为在结节中检查到成虫，更常以皮肤组织切片中查见微丝蚴为依据。血液和尿中偶可见微丝蚴，尤其是在治疗后。裂隙灯检查时，也可在角膜和眼球前房见到微丝蚴。

进行皮损检查时，用针尖或钩子挑起一小部分皮肤，以解剖刀削去针尖顶部拉伸的皮肤。巩膜角膜炎钻孔器也可以用于获取无血的皮肤样本。皮肤样本取自病变处或肩胛、小腿部位（非洲型）肩胛、三角肌处、臀部（美洲中部型）等部位。一旦取下皮肤样本，需保存在生理溶液中（如生理盐水）。一般在半小时内（重度感染）或24 h内（轻度感染）即可在显微镜下观察到微丝蚴。

1. 直接检测

(1)显微镜检查：微丝蚴缺乏鞘膜，309μm×(5～9)μm。尾部呈锥形，多卷曲或折叠，没有尾核（图147-1d和图147-2c）。

(2)核酸检测技术：目前研究实验室常用NAAT通过靶向皮肤组织中的O-150重复序列来检测盘尾丝虫DNA，显示出了高特异性与敏感性，提示皮肤样品中存在目标虫体[34,76]。

2. 血清学试验 由于从皮肤或眼部直接检查虫体具有损伤性、相对不灵敏，免疫学诊断法可能更为适用。抗丝虫IgG抗体检测，在盘尾丝虫感染者中检测呈阳性，但对血液微丝蚴感染者而言该法特异度较低，阳性预测值不高；3种重组抗原用于传统ELISA诊断盘尾丝虫病则有良好的敏感性和特异性，可达100%[77]。新的检测方法包括四种重组抗原用于高通量快速免疫荧光沉淀反应，敏感性可达100%，区分盘尾丝虫病与其他丝虫感染的特异性可达80%～90%[78]。

对于盘尾丝虫感染的血清学试验，一种称为OV-16的抗原已被用作感染的早期生物标志物。已经开发了商业化的OV-16 RDT；该SD Bioline盘尾丝虫病 IgG_4 RDT特异性为95%～99%，敏感性约80%[79-82]。虽然主要用作确认消灭的监测工具，但它可能有助于确认疑似盘尾丝虫病患者的诊断。

(六)治疗

治疗的主要目的在于预防不可逆皮损的出现，缓解临床症状。药物疗法是主要治疗方案，如

果结节部位在头部，可推荐手术治疗，因为微丝蚴可发育为成虫进入眼部。伊维菌素是一种半合成的大环内酯类药物，目前是治疗盘尾丝虫病的一线药物，通常按成虫的寿命(10～15年)每年或每半年一次给药。大部分患者对药物治疗没有或仅有轻度反应。接受治疗的个体中有1%～10%出现瘙痒、皮肤水肿和斑丘疹，偶见明显的眼部并发症，低血压很少出现。

动物毒理学与致畸实验表明伊维菌素禁用于妊娠或哺乳期女性。尽管伊维菌素能显著降低血液中微丝蚴的浓度，其疗效也可能是短暂的(在部分病例中<3个月)。因此，对于一部分症状持续存在的病例，伊维菌素的使用频率应高于每年1次[83]。

伊维菌素禁用于非洲旋盘尾丝虫与罗阿罗阿丝虫混合流行的地区，因为罗阿罗阿丝虫高微丝蚴血症患者治疗后可出现严重的脑病[84]。然而，一种新的基于移动电话的视频显微镜平台 LoaScope[85]已被用作一种联系点方法，用于识别有严重不良事件风险的人群(每毫升超过20 000微丝蚴)，并将它们从名为"测试而不治疗"基于伊维菌素的MDA策略中排除[86]。

6周疗程的多西环素治疗可针对沃尔巴克体内共生体，治疗微丝蚴结节，使雌性成虫处于长期不育状态[87-88]。

(七)预防

预防感染主要是大规模使用伊维菌素治疗[89-90]。对于杀虫剂喷洒易感的高度流行区，媒介控制是有益的；然而，对于大多数盘尾丝虫病流行区来说，媒介控制并不适用。基于社区的每6～12个月伊维菌素治疗已用于流行区的传播阻断。该措施结合媒介控制，已帮助消灭了非洲及拉丁美洲地区的核心流行区的寄生虫。尚无药物对盘尾丝虫病有预防作用，也无相关疫苗。

三、罗阿罗阿丝虫(*Loa loa*)

(一)分类

罗阿丝虫属线虫纲第三进化枝(色矛亚纲 Chromadoria：旋尾亚目 Spururina)的旋尾总科：盘尾科。

(二)病原描述

成虫寄生于人体皮下组织；微丝蚴在血液中循环呈周期性，峰值一般出现在中午12时至下午2时。

微丝蚴及成虫的形态学及其他特征见表147-1，图147-1和图147-2。

(三)流行病学和传播

罗阿罗阿丝虫的分布局限在非洲中西部的雨林地带[91]。斑虻(鹿蝇)是其传播媒介。

(四)临床特征

罗阿罗阿丝虫的感染可表现为无症状的微丝蚴血症，在成虫移行至眼结膜下才被觉察(俗称"眼虫")。典型临床表现为卡拉巴丝虫性肿块(局部暂时性神经性水肿)，多发于四肢部位。如伴随炎症侵犯附近关节或周围神经，则出现相应症状(如神经病变)。肾病(可能与免疫调节系统有关)、脑病和心肌炎罕有发生。

罗阿罗阿丝虫病流行区当地居民感染表现和外来人群感染表现不同[92-94]。后者的过敏性症状更为严重。这类患者常见更严重的卡拉巴丝虫性肿块，且少有微丝蚴血症。此外，非流行区居民受到感染后，嗜酸粒细胞数与抗丝虫抗体滴度都极高。

(五)诊断

寄生虫病原学检查是确诊依据，在外周血查见微丝蚴或在治疗后从眼部检查、皮肤组织活检查到成虫。尤其对去流行区旅行者，诊断还需相关的临床依据。

1. 直接检测

(1)显微镜检查：微丝蚴有鞘膜，长约300 μm。雌性成虫长50～70 mm，直径0.5 mm，雄性成虫长25～35 mm，直径0.25 mm。与淋巴丝虫不同，罗阿罗阿丝虫胞核延伸至其尾部，沿尾部呈现不规则排列(图147-1c和图147-2d)。鞘膜不被吉姆萨染液着染。

(2)核酸检测技术：基于NAAT试验方法，通过靶向检测罗阿罗阿丝虫散在重复序列LLMF72和LLMF269和定量检测罗阿罗阿丝虫DNA的方法，目前已在实验室中使用，具有高度敏感性和特异性[34,95]。

2. 血清学试验 现有检测方法使用布鲁线虫

或恶丝虫属的粗抗原提取物，无法区分罗阿罗阿丝虫及其他丝虫。这类检测方法在流行区人群中的应用意义有限，因为在部分地区个体抗体阳性率可达95%。罗阿罗阿丝虫重组蛋白LLSXP-1的常规基于IgG_4的ELISA，经检测有良好的特异性，但敏感性有限(50%)[96]。结合LLSXP-1的荧光免疫沉淀检测可将敏感性提升近100%，且具有样品处理快速，高通量的特点[97]。最近，一种针对LLSXP-1的RDT测量IgG的方法已经被开发出来，并显示其敏感性大于90%，特异性接近95%[98]。

抗丝虫病IgG和IgG_4虽然是非特异性的，但是对于来自流行病区的、有提示性临床症状和不明原因的嗜酸粒细胞增多症的访客，其有助于罗阿罗阿丝虫病的确诊。

(六)治疗与预防

乙胺嗪对罗阿罗阿丝虫的成虫和微丝蚴均有效，但需要多个疗程才能治愈[99]。可以从美国疾病预防控制中心获得一种正在研究的新药。重症微丝蚴血症的治疗过程中可出现过敏或其他炎症反应，包括中枢神经系统病变、昏迷及脑炎[84,100-101]。重度感染初期可通过血浆置换治疗，去除血中微丝蚴，继而进行糖皮质激素配合小剂量乙胺嗪治疗。如果治疗中没有发生毒副反应，可快速减少糖皮质激素剂量，逐步增加乙胺嗪剂量。阿苯达唑或伊维菌素(尚未被FDA批准该用途)对降低微丝蚴数量也有效[102]，但严重微丝蚴血症患者禁用伊维菌素治疗[84,100-101]。乙胺嗪每周1次给药可以作为罗阿罗阿丝虫病疫区临时居民的有效预防措施[103]。

四、曼森线虫(*Mansonella* species)

(一)分类

常现曼森线虫(*Mansonella perstans*)、奥氏曼森线虫(*Mansonella ozzardi*)和链尾曼森线虫(*Mansonella streptocerca*)属于线虫纲第三进化枝(色矛亚纲 Chromadoria；旋尾亚目 Spirurina)的旋尾总科、盘尾科。

(二)病原描述

常现曼森线虫的成虫寄生于体腔(心包、胸膜、腹膜)及肠系膜、肾周和腹膜后组织，而奥氏曼森线虫成虫的寄生部位还不清楚，其微丝蚴在血液中均无周期性特点。链尾曼森线虫成虫的寄生部位是皮肤，其微丝蚴主要在皮肤可见。常现曼森线虫成虫及微丝蚴的结构和特征详见表147-1和图147-1、图147-2。

(三)流行病学和传播

常现曼森线虫分布于非洲中部和南美的东北部，人主要通过库蠓(*Culicoides* species)叮咬感染。链尾曼森线虫主要分布于非洲从加纳到扎伊尔的热带雨林带，人主要通过库蠓叮咬感染。奥氏曼森线虫的分布主要在中美和南美及加勒比海群岛某些地区，人主要通过毛库蠓(*Culicoides furens*)和蚋(*Simulium amazonicum*)叮咬感染。

(四)临床表现

大多数常现曼森线虫感染者无症状，其临床表现主要是手臂、面部和身体其他部位短时血管水肿(类似于罗阿罗阿丝虫感染引起的卡拉巴丝虫性肿块)、瘙痒、发热、头痛、关节痛、神经或精神症状、右上腹痛，偶见心包炎和肝炎[104]。

链尾曼森线虫感染引起的临床表现与皮肤有关：瘙痒、皮疹及色素改变等。这些症状被认为是继发于微丝蚴的炎症反应。此外，大多数感染者还会出现腹沟股淋巴结肿，淋巴结会因慢性淋巴腺炎留下瘢痕。但是，也有许多链尾曼森线虫感染患者完全没有症状[105]。

奥氏曼森线虫感染者没有明显特征，并且，也有人认为奥氏曼森线虫并不是病原体；但是，头痛、关节痛、发热、肺部症状、淋巴结炎、肝大及瘙痒等症状均与奥氏曼森线虫的感染有关[106-107]，还有感染者出现角膜炎的报道[108]。

(五)诊断

常现曼森线虫感染的诊断以病原学检查为主，以在血液或其他体液(浆膜腔积液)找到微丝蚴为准。其微丝蚴较小[203 μm×(4～5)μm]、尾部钝圆、有核。此外，常现丝虫病还表现为外周血嗜酸性粒细胞增多及抗丝虫抗体升高[104]。奥氏曼森线虫感染的诊断以在外周血中找到典型的微丝蚴为准。其微丝蚴224 μm×(4～5)μm、尾部细长、无核(图147-1f和图147-2g)。NAAT检测敏感性

更高[109]。链尾曼森线虫感染的诊断以皮下找到典型微丝蚴为准(见盘尾丝虫病诊断部分)。在盘尾丝虫和链尾曼森线虫流行区,要注意区分微丝蚴的种类。链尾曼森线虫的微丝蚴无鞘膜、尾部细长、大小为210 μm×(5～6) μm。链尾曼森线虫最典型的特征是其尾部弯曲、有核(图147-2f)。

(六)治疗和预防

1. 常现曼森线虫 尝试过很多疗法,但至今没有一种方法对常现丝虫病特别有效。然而,随着常现曼森线虫体内沃尔巴克体的确定[110],在马里的一项随机试验中,已经证明多西环素(每天200 mg,6周)治疗这种感染有效[111]。

2. 链尾曼森线虫 乙胺嗪对治疗链尾丝虫微丝蚴和成虫都非常有效。但像治疗盘尾丝虫病一样,会引起荨麻疹、关节痛、肌肉痛、头痛和腹部不适等症状。由于这些不良反应,乙胺嗪在非洲多数国家是禁用的,因而也限制了乙胺嗪用于治疗链尾曼森线虫。因此,目前治疗使用伊维菌素[112]。

3. 奥氏曼森线虫 主要使用伊维菌素治疗[113-114],但一些患者有严重不良反应[115-116]。目前,曼森线虫的预防主要还是依赖衣物等个人防护装备和驱蚊胺、苄氯菊酯等驱避剂,除此之外没有更好的预防措施。

参考文献请扫二维码查阅

第148章　绦　虫

HECTOR H. GARCIA，JUAN A. JIMENEZ，HERMES ESCALANTE

（孙恩华　译；曹建平、陈家旭　审校）

绦虫(cestodes)的特点是虫体扁平，由头或头节(scolex)(有固着器官-吸盘、小钩和吸槽)，颈节(细胞再生，形成链体)和链体组成，链体由很多片段或节片组成。随着新的节片从颈节产生，现有的节片会长成熟并离颈节越来越远。在更远处的是孕节，被几乎全部充满子宫的虫卵占据，虫卵可通过带虫者的粪便进行传播，无论是内部完整的孕节或是断裂后的孕节。在某些种类的绦虫中，节片可以移动至肛门外。

绦虫寄生在小肠内，以头部或头节作为唯一的固着器官吸附在黏膜上。它们在宿主肠道内通过其头部和体表来吸收营养。因此，它们已经发育了头部固着器官，如小钩、吸盘或具有纵向吸力的浅沟槽(吸槽)(图 148-1)，以及特殊的被膜。

寄生在人体肠道的绦虫有 4 种：阔节裂头绦虫(*D. latum*)、牛带绦虫(*T. saginata*)、猪带绦虫(*T. solium*)和短膜壳绦虫(*H. nana*)(表 148-1)。它们的大小、中间宿主和其他特征都有明显的差异，长度从 12 m 的阔节裂头绦虫到只有 3 cm 的短膜壳绦虫。更为罕见的是，犬复孔绦虫(*D. caninum*)和缩小膜壳绦虫(*H. diminuta*)也能寄生于人体消化道；这些寄生虫在第 150 章有详细介绍。除此之外，如果食入绦虫的虫卵，许多绦虫的幼虫(larvae)都能引起人体的疾病，主要是囊尾蚴病(cysticercosis)(猪带绦虫)、囊型棘球蚴病[细粒棘球绦虫(*E. granulosus*)]和泡型棘球蚴虫病[多房棘球绦虫(*E. multiloculari*)]。罕见的人体绦虫幼虫感染包括多头蚴病[多头绦虫(*T. multiceps*)]、裂头蚴病[曼氏迭宫绦虫(*S. mansonoides*)]和肥头绦虫(*Taenia crassiceps*)引起的囊尾蚴病。绦虫感染，尤其是绦虫幼虫感染仍是引起发病和死亡的重要原因，不仅在不发达国家，而且在工业化发达国家，特别是在农村地区或流行病区移民中最为常见。

一、阔节裂头绦虫

作为鱼源性绦虫，阔节裂头绦虫是寄生于人体肠道内最长的寄生虫。在以鱼为食的哺乳动物，如犬科或猫科(保虫宿主)体内也很常见，该虫与感染人体的其他绦虫成虫在形态学、生物学和流行病学方面有明显不同。

(一)分类学

阔节裂头绦虫属于扁形动物门(Platyhelminthes)，Neodermata 亚门(Neodermata)，绦虫纲(Cestoidea)，真绦虫亚纲(Eucestoda)，假叶目(Pseudophyllidea)，裂头科(Diphyllobothriidae)，裂头属(*Diphyllobothrium*)。

(二)病原描述

1. 绦虫成虫　成虫可长到 15 m，在人体小肠内生活 20 年或更久。它呈象牙色并在头节的背侧和腹侧面各有一吸槽[1-2]。阔节裂头绦虫的节片宽大于长(宽 8 mm，长 4 mm)，是比较容易辨认的，因为其生殖孔位于节片的中心，而其他人体绦虫的生殖孔位于节片的侧边缘。在新鲜排出的粪便样本中，孕节中央盘绕的子宫为棕黄色。子宫孔位于节片的中心，在生殖孔附近。

2. 虫卵　未胚胎化而有卵盖的虫卵随粪便排出。该绦虫的虫卵呈卵圆形，和吸虫的虫卵相似但是较小(长 58～75 μm，宽 44～50 μm)，并有明显的卵壳。卵盖的对侧一端通常有一球形的小棘。虫卵很多，常从节片排出。

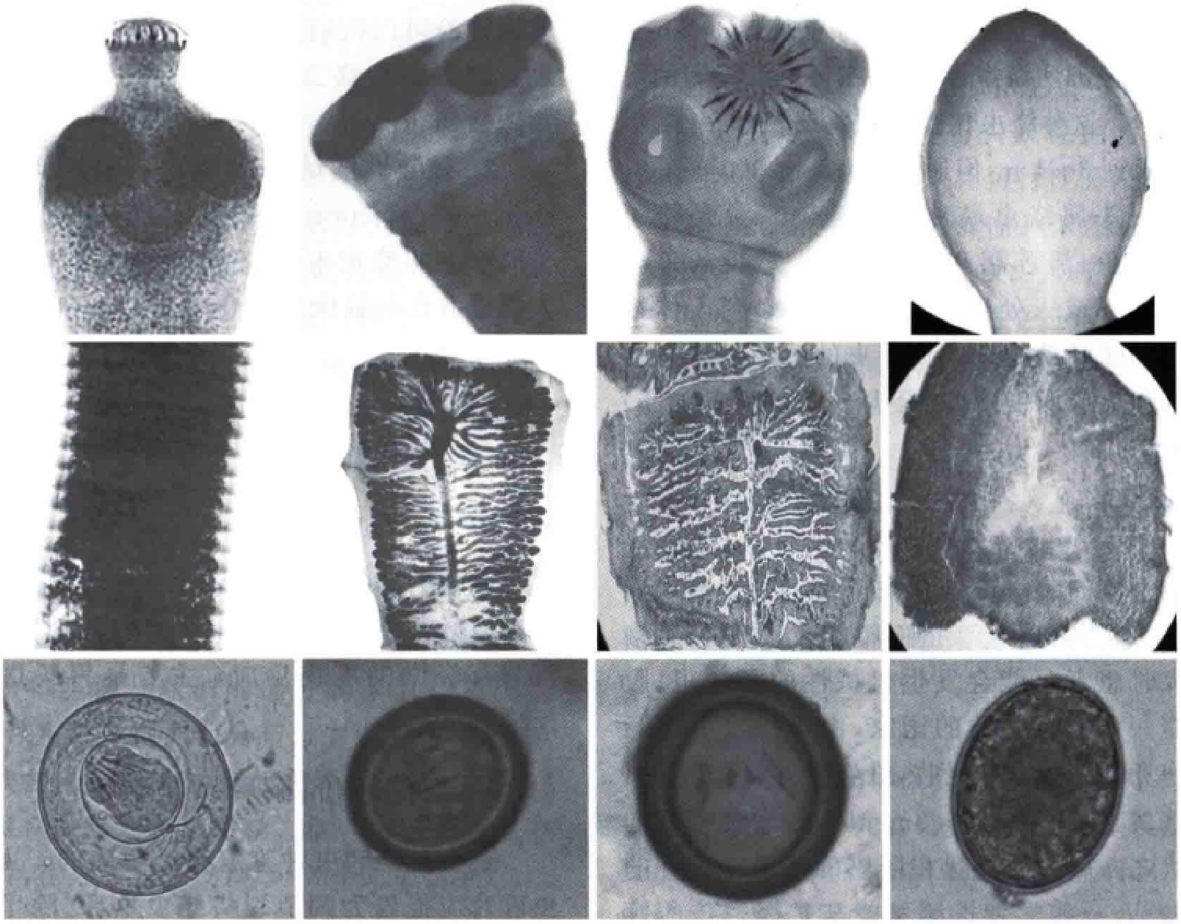


图 148-1 短膜壳绦虫、牛带绦虫、猪带绦虫和太平洋裂头绦虫(从左到右)的头节(上行)、孕节(中间行)和虫卵(下行)。太平洋裂头绦虫盘绕的子宫,牛带绦虫无钩的头节,牛带绦虫和猪带绦虫相似的虫卵。太平洋裂头绦虫与阔节裂头绦虫的形态学特征相似,见彩插

表 148-1 感染人体部分绦虫的特征

物种	长度(cm)	头节	孕节	中间宿主
阔节裂头绦虫	1200	勺形,2 个吸槽	玫瑰花形中间子宫	桡足类,鱼
牛带绦虫	600	方形,4 个吸盘,无钩	>15 个主要子宫分枝	牛
猪带绦虫	300	方形,4 个吸盘,有钩(2 圈)	<12 个主要子宫分枝	猪,人
短膜壳绦虫	3	球形,4 个吸盘。有钩(1 圈)	袋形子宫	昆虫,啮齿类,人

3. 幼虫 虫卵内的胚胎在水体环境中发育数周后,孵化出具有纤毛的六钩蚴(oncosphere)(钩球蚴)。钩球蚴被适合的淡水桡足类(剑水蚤)吞食后继续发育。在桡足类体内发育为健全的幼虫,原尾蚴(procercoid),是虫体的第二个幼虫阶段,该阶段可感染第二中间宿主(鱼)。在鱼体内,原尾蚴移行至肌肉内发育为三期幼虫阶段,即为全尾蚴或裂头蚴(sparganum),该阶段能感染人或动物(犬类或猫科类动物)。

(三)流行病学、传播和预防

阔节裂头绦虫的地理分布包括斯堪的纳维亚半岛的湖区、北欧的其他地区、苏联、芬兰、日本北部、北美中西部、阿拉斯加、加拿大及南美洲的西南海岸。其他的裂头属绦虫[太平洋裂头绦虫(*D. pacificum*)、心形裂头绦虫(*D. cordatum*)、厄氏裂头绦虫(*D. ursi*)、柳叶状裂头绦虫(*D. dendriticum*)、茴香状裂头绦虫(*D. lanceolatum*)、达勒裂头绦虫(*D. dalliae*)和米子裂头绦虫

(*D. yonagoensis*)]也有相关的人体感染的病例报道，但并不常见[2-3]。太平洋裂头绦虫是Nybellin于1931年在南美洲西海岸，特别是在秘鲁和智利的海水中发现的。这种绦虫比阔节裂头绦虫小很多，尽管偶尔会长到3～4 m，但通常只有50～200 cm。

人类裂头属绦虫最常见的感染来源是梭子鱼、江鳕、鲈鱼、流苏鹬和大菱鲆[2]。感染的鱼类(未煮熟，生鲜或未处理好)传播裂头蚴到人体或其他食鱼的哺乳动物。裂头绦虫的感染可通过食用煮熟的鱼类或深度冷冻(至少－10℃冷冻24 h)的鱼来预防。

(四)临床表现

感染个体的节片通过粪便排出。在一些人群中，该寄生虫感染并不产生临床症状，但是当感染虫体太大时患者可能会发生机械性的肠梗阻、腹泻和腹痛。尤其在北欧的国家，由于该虫可与肠上皮细胞竞争维生素的吸收，维生素B_{12}的缺失引起的恶性贫血(pernicious anemia)是该虫感染的临床症状之一。这种情况在斯堪的纳维亚以外的国家很少见，一些学者推测可能与基因遗传的倾向有关。

(五)样本的采集、运输和储存

为了进行虫种鉴定，虫卵应保存在5%～10%的福尔马林溶液中。如需提取DNA，样本最好保存在95%的乙醇中。电子显微镜检查需要将样本置于二甲砷酸盐缓冲液中或戊二醛溶液中。用生理盐水冲洗成虫样本，并将其在55℃温热生理盐水短时间孵育(5 min)后，虫体更为松弛，可用两片载玻片进行压片后固定储存，以便于观察和形态学鉴定。固定剂可采用10%的福尔马林溶液、乙酸-福尔马林-乙醇溶液或乙酸钠-乙酸-福尔马林溶液。固定的压片可采用注入Semichon洋红或印度墨汁染色。节片也可做成切片后用苏木素和伊红染色，形态学特征在整体固定时更容易观察。

(六)直接检测

1. 显微镜检查 粪便中的虫卵通过显微镜镜检很容易检出。也可采用漂浮或沉淀技术。但由于虫卵有卵盖，通常不用漂浮浓集法收集；如果采用该方法，液面表层和沉淀物都需要检查。由于上述原因，大部分实验室常采用沉淀浓集法。低倍镜镜检可以很容易地鉴定头节和节片(图148-1)。阔节裂头绦虫的鉴定不采用培养和抗原检测法。

2. 核酸扩增试验 尽管核酸扩增试验(nucleic acid detection techniques)已被应用于各种裂头属绦虫的鉴定中，但在常规绦虫的收集和鉴定方面没有任何临床表现[4]。

(七)血清学试验

不使用血清学试验。

(八)治疗

吡喹酮(praziquantel)和氯硝柳胺(niclosamide)都是有效的治疗药物。在使用推荐剂量时，两者都只有轻微的不良反应，主要是胃肠道的不良反应。

(九)结果的评价、解释和报告

粪便镜检和虫种鉴定都是明确的。虫卵或绦虫碎片应报告为阔节裂头绦虫虫卵[除了南美洲外，太平洋裂头绦虫(*D. pacificum*)是该区域的常见裂头绦虫]。其他感染人类的裂头绦虫较为少见。

二、牛带绦虫

也被称为牛肉绦虫，牛带绦虫在全球范围内广泛流行。人体是其唯一的终宿主。牛带绦虫感染不会给宿主带来大的危害，与猪带绦虫的鉴别诊断是很重要的，因为猪带绦虫会引起神经型囊虫病。

(一)分类学

牛带绦虫属于扁形动物门，Neodermata亚门，绦虫纲(Cestoidea)，真绦虫亚纲，圆叶目，带绦虫科，带绦虫属。

(二)病原描述

1. 成虫 牛带绦虫的成虫长4～8 m，头节有4个吸盘和1个无小钩(无钩)的顶突。孕节的长大于宽(18～20 mm，5～7 mm)。在每个节片的中后部都有生殖孔，卵巢只分2叶，且有阴道括约

肌。孕节的肌肉更为发达且能活动，可从链体上脱落并移行至肛门外（是该病的特异性病理特征）。

2. 虫卵 牛带绦虫和猪带绦虫的虫卵在形态学上不能区分。它们均为球形，直径为30～40 μm，有着由胶原蛋白亚基组成的厚的棕黄色辐射状条纹的壳（胚膜），虫卵成熟后壳会变得更厚。虫卵常被一层薄的膜所包裹（图148-1）。虫卵内部为六钩蚴。

3. 幼虫 无钩的头节嵌于充满液体的包囊，即囊尾蚴内。囊尾蚴长4～6 mm，宽7～10 mm，在组织中呈珍珠状。

(三)流行病学、传播和预防

尽管牛带绦虫在非洲、美国的中部和南部、亚洲的东部和西部及欧洲的部分国家流行较为广泛，但是该虫种呈世界性分布。牛作为中间宿主，通过放牧食入被虫卵污染的牧草后感染，虫卵在牛体内发育成感染性囊尾蚴。食入生的或未煮熟的牛肉后，在人体大概发育2～3个月后成熟。

东南亚地区有一种与牛带绦虫非常相似的人体带绦虫（亚洲牛带绦虫、亚洲带绦虫或中国台湾带绦虫）（*T. saginata asiatica*、*T. asiatica* 或 *Taiwan taenia*）。这种绦虫的囊尾蚴期主要寄生在猪而很少寄生在牛。该种带绦虫的成虫可以感染人，它的形态与牛带绦虫非常类似[5-6]。

(四)临床表现

尽管患者在感染后不出现临床症状，但常在患者的内裤上发现被排出的节片。成虫可引起腹部不适、腹泻，或由于其体型较大而引起宿主的肠梗阻。

(五)标本的采集、运输和储存

见阔节裂头绦虫的“样本的采集、运输和储存”部分。

(六)直接检测

1. 显微镜检查 典型的带绦虫虫卵可在粪便中发现，沉淀法或改良加藤法在检测粪便中的带绦虫虫卵时比其他浓集方法敏感。找到带绦虫的虫卵并不意味着能进行依据虫种的特异性感染的诊断；通常需要鉴定随粪便排出或主动从肛门逸出的孕节。节片的鉴定依赖于其形状、大小和子宫的形态（可向子宫注入墨汁或进行苏木素染色）。在牛带绦虫，每个子宫有15～20个分支(图148-1)。

采用酶联免疫法进行粪抗原的检测开展于1990年，但由于该方法缺乏可行性而仅用于研究。

2. 核酸检测技术 特异性PCR鉴定在DNA鉴定和区分牛带绦虫和猪带绦虫的检查中已有应用报道。尽管有些分子方法已被建立进行粪便中虫卵的检查，但大部分该技术的实施需要虫体材料[7-10]。

(七)血清学试验

牛带绦虫囊尾蚴的ELISA血清学抗原检查已通过牛带绦虫单克隆抗体的制备进行。尽管该方法能进行虫荷数每只感染性动物<50囊尾蚴的检查，但是除了科研外并未被常规应用[11-13]。

(八)治疗

吡喹酮和氯硝柳胺都是有效的治疗药物。在使用推荐剂量时，两者都只有轻微的不良反应，主要出现在胃肠道。在猪带绦虫的流行区，吡喹酮的使用可能会影响潜在的神经型囊虫病（neurocysticercosis），从而引起头痛或癫痫的发作。氯硝柳胺不能被肠道吸收，因此不会产生上述危害[14]。

(九)结果的评价、解释和报告

虫卵应被报告为“带绦虫卵”，因为直接观察不能确定带绦虫的种类。发现带绦虫的虫卵后要通知主治医生以确保及时的治疗。虫体排出后（自然地或治疗后）头节的出现也需要记录，因为需要根据头节的形态进行虫种的确定。如果头节没有找到，治疗失败的概率将增加。

三、猪带绦虫

也称为猪肉绦虫，猪带绦虫有着广泛的地理分布。该虫的感染对人体健康影响很大，因为其幼虫导致人体脑部的感染会引起癫痫（神经型囊虫病）[15]。

(一)分类学

猪带绦虫属于扁形动物门，Neodermata亚门，绦虫纲（Cestoidea），真绦虫亚纲，圆叶目，带科，带属。

(二)病原描述

1. 成虫 猪带绦虫的成虫长 2～4 m，头节上有 4 个吸盘，顶突上长有两圈小钩。孕节的长和宽相等(约 1 cm)。在每个孕节片的中后端都有生殖孔。在成熟的节片中，卵巢分为 2 个主叶和 1 个副叶(牛带绦虫无)，并缺乏阴道括约肌(牛带绦虫有)。孕节的子宫分支少(<12)(图 148-1)。由于猪带绦虫虫卵可感染人体并引起囊虫病，所以建议在处理节片或感染性粪便时需格外小心。

2. 虫卵 牛带绦虫和猪带绦虫的虫卵在形态学上不能被区分。它们均为球形，直径为 30～40 μm，有着由胶原蛋白亚基组成的相当厚的棕黄色辐射状条纹的壳(胚膜)，虫卵成熟后壳会变得更厚。虫卵常被一层薄的膜所包裹(图 148-1)。虫卵内部为六钩蚴。

3. 六钩蚴 充满囊液的囊状物(囊尾蚴)比牛带绦虫的囊尾蚴大，直径 8～10 mm。它们寄居于猪的组织中，在脑和肌肉中最多。

(三)流行病学、传播和预防

猪带绦虫病和囊虫病在发展中国家和地区高度流行，包括拉丁美洲、亚洲的大部分地区、非洲撒哈拉地区及大洋洲部分地区，这些地区以猪为主要食物来源。目前，感染在发达的工业国家也有所增加，这是由于猪带绦虫携带者从流行地区移民引起的[6,15]。

人体是猪带绦虫的唯一终宿主。人体猪带绦虫病是由食入猪带绦虫囊尾蚴污染的猪肉感染的。相反的，猪带绦虫虫卵会引起猪(常见中间宿主)和人的囊虫病。猪的囊虫病是由卫生条件差的地方存在感染性虫卵污染的粪便而引起。人体感染是通过猪带绦虫带虫者而导致粪口污染传播发生的，通常发生在同一户人家或其他封闭环境内。秘鲁北部地区的一项大规模研究项目证实了一种可以阻断猪肉绦虫传播方法的可行性，即分别采用氯硝柳胺治疗人、奥芬达唑治疗猪，以及对猪进行疫苗接种[16]，有望最终消除和消灭猪带绦虫。

(四)临床表现

人猪带绦虫病是由食入了含有感染性囊尾蚴的未煮熟的猪肉或猪肉制品而感染。带绦虫病通常不表现出症状，大部分患者没有注意粪便中的节片。猪带绦虫感染的临床表现在于出现神经型囊虫病的风险(如下)，这由带绦虫的携带者及其密切接触者而引起的[15]。

(五)标本的采集、运输和储存

见阔节裂头绦虫的“样本的采集、运输和储存”部分。处理猪带绦虫的节片或污染的粪便时需要在适当的生物安全条件下(生物安全级别 2 级或更高)以避免囊尾蚴的污染。

(六)直接检测

1. 显微镜检查 典型的带绦虫虫卵可在粪便中发现，沉淀法或改良加藤法在检测粪便中的带绦虫虫卵时比其他浓集方法敏感。找到带绦虫的虫卵并不意味着能进行依据虫种的特异性感染的诊断；通常需要鉴定粪便中的孕节或少见的头节。节片的鉴定依赖于其形状、大小和子宫的形态(可向子宫注入墨汁或进行苏木素染色)。在猪带绦虫，每个子宫的分支较少(图 148-1)。

采用酶联免疫法进行粪抗原的检测开展于 1990 年。粪抗原 ELISA 检测比显微镜镜检敏感得多，因此，建议使用该方法进行人体带绦虫感染的检测(尤其是在猪带绦虫感染的病例中，有囊虫病传播的风险性)，以及监测治疗的有效性，但它的可用性仍然有限[17]。

2. 核酸检测技术 特异性 PCR 检测技术在区分牛带绦虫和猪带绦虫的研究中已经有报道。尽管有些分子方法已被建立进行粪便中虫卵的检查，但大部分该技术的开展需要虫体材料[7-10]。

(七)血清学试验

目前，对于带绦虫成虫特异性血清的检测方法已经开展，其方法有较高的敏感性和特异性。大多数情况下，针对猪带绦虫抗体血清学检查与脑囊虫病的诊断检测相关。通过酶联免疫电转印迹分析法进行抗体检测是可选方法，在包囊可见的病例中敏感性为 98%，特异性为 100%[18]。基于 ELISA 中与牛带绦虫的特异性交叉反应，血清或脑脊液中的猪带绦虫抗原检测可在人体囊虫病病例中应用。尽管该方法能进行虫荷数每只感染性动物<50 个囊尾蚴的检查，但是除了科研外并未常规应用。猪带绦虫抗原检测很可能成为监测

重症患者、蛛网膜下隙脑囊虫病的有效方法，因为在这2种病例中会有较高的抗体水平[19]。

(八)治疗

吡喹酮和氯硝柳胺都是有效的治疗药物。在使用推荐剂量时，两者都只有轻微的不良反应，主要是胃肠道不良反应。在猪带绦虫的流行区，吡喹酮的使用可能会影响潜在的神经型囊虫病，从而引起头痛或癫痫的发作。氯硝柳胺不能被肠道吸收，因此不会产生上述危害[14]。

(九)结果的评价、解释和报告

虫卵应被报告为"带绦虫卵"，因为直接的观察不能确定带绦虫的种类。发现带绦虫的虫卵后要通知主治医生以确保及时的治疗。虫体排出后(自然地或治疗后)头节的出现也需要记录，因为需要根据头节的形态进行虫种确定的诊断。如果头节没有被找到，治疗失败的概率将增加。

四、短膜壳绦虫

短膜壳绦虫是寄生于人体肠道内最小的绦虫，且在全球范围内分布。它能在人和人之间传播(不需要中间宿主)[3]。

(一)分类学

短膜壳绦虫属于扁形动物门，Neodermata亚门，绦虫纲，真绦虫亚纲，圆叶目，膜壳科(Hymenolepididae)，膜壳属(*Hymenolepis*)。

(二)病原描述

1. 成虫 成虫长度为2～4 cm，存活时间约为1年。头节有4个吸盘和1圈小钩。

2. 虫卵 虫卵的直径为30～50 μm，卵壳薄，虫卵的中央有六钩蚴，与外膜之间有较大的空隙。胚膜两端略突起并由该处发出4～8根丝状物，弯曲延伸在卵壳和胚膜之间(图148-1)。这些细丝在缩小膜壳绦虫中是没有的。虫卵在宿主的肠道内孵化，六钩蚴侵入黏膜发育成幼虫阶段。

3. 幼虫 似囊尾蚴的头节内陷，但并不在充满囊液的包囊中。它们寄生于小肠的黏膜上，几天后再回到肠腔发育为初期成虫。

(三)流行病学、传播和预防

短膜壳绦虫是鼠类的常见寄生虫，其生活史的特点是以甲虫为中间宿主。在人体内，传播通常是因为食入含六钩蚴的感染性虫卵引起的。虫卵被食入后，一个实体的幼虫，似囊尾蚴在小肠肠壁上进行发育。随后，幼虫进入肠腔并在此经过2～3周发育为成虫。在食入短膜壳绦虫虫卵的甲虫体内，似囊尾蚴在其体腔内发育，并有厚的壳保护。尽管人体感染是因偶然性食入感染性甲虫(通常出现在干燥的谷物中)而引起，但直接感染更为常见，主要因为单位和家庭卫生不合格所致。人体感染短膜壳绦虫的特征是自体感染，这会产生大量的虫荷数。自体感染在虫卵从成虫排出后发生，虫卵在宿主的小肠和肠腔内迅速孵化并侵入肠壁；似囊尾蚴形成，随后再回到肠内发育为成虫。

(四)临床表现

大多数感染没有症状，但是膜壳绦虫病可能会表现为腹痛、腹泻、头痛或易怒，这有可能与虫荷过重有关[20-21]。在一例HIV感染的患者中，人们发现异常增殖和发生遗传变异的绦虫细胞可以像肿瘤转移一样，侵袭宿主淋巴结和肺脏[22]。

(五)样本的收集、运输和储存

见阔节裂头绦虫的"样本的采集、运输和储存"部分。

(六)直接检测

显微镜检查 通过显微镜镜检从粪便中找到球形虫卵为确诊依据。漂浮法或沉淀法更好。节片(图148-1)很少被看到，因为它们从链体上脱落后就破碎了。培养法、抗原检测和核酸技术都不用作短膜壳绦虫的检查和鉴定。

(七)血清学试验

ELISA抗体检测只在科研中使用而不用于临床检测中[23]。

(八)治疗

吡喹酮和氯硝柳胺都是有效的治疗药物。在使用推荐剂量时，两者只有轻微的不良反应，

主要是胃肠道的副作用。吡喹酮二次给药 10～15 天后能减少复发的可能性。氯硝柳胺需服用 7 天，这是由于该药不能被吸收且不能作用于肠黏膜上的似囊尾蚴。硝噻醋柳胺也是可选的有效治疗药物[24]。

(九)结果的评价、解释和报告

虫卵具有特征的且应被报告为短膜壳绦虫虫卵。最常见的鉴别诊断是与缩小膜壳绦虫的区分，但该种绦虫很少感染人体。缩小膜壳绦虫的虫卵更大一些，缺乏两端的丝状物，并有较宽的内部空隙，因此可通过显微镜镜检区分。

五、感染人体的绦虫幼虫

猪带绦虫、细粒棘球绦虫、多房棘球绦虫的幼虫可以感染人，偶尔也可见迭宫绦虫属、多头绦虫和肥头带绦虫的幼虫侵入人体组织。

(一)囊虫病[猪带绦虫(*T. solium*)]

在猪带绦虫的正常生活史中，人作为终宿主而猪是中间宿主，其幼虫阶段或囊尾蚴寄生于猪体内。猪囊虫病(porcine cysticercosis)严重影响猪场养殖业的经济。但是更严重的影响是人的囊虫病[15]。幼虫的包囊寄居在人体的中枢神经系统(图 148-2)，引起癫痫或其他神经症状。实际上，在流行区的人体神经型囊虫病大部分都有癫痫症状[25-26]。神经型囊虫病的临床表现因虫体的数量、大小、病灶的损害程度和宿主免疫反应的强弱而异。症状是多样性且无特异性的。虫体寄生在脑实质常引起癫痫和头痛，而位于脑室或蛛网膜下隙("葡萄状"囊尾蚴病)的病变会导致颅内压增高和脑积水。通过计算机断层扫描技术(CT)或磁共振(MRI)脑部影像学方法进行诊断，血清学检查可确诊。CT 检查的费用较低(在该病流行的贫困地区非常重要)，是更为可取的诊断方法，在检查钙化的囊尾蚴时有更好的敏感性。相反地，MRI 对于小病灶的检查有更高的敏感性，尤其在病灶接近颅骨和脑室内的时候可采用该方法。血清学方法是采用 7 个纯化的幼虫糖蛋白抗原进行免疫印迹检查，除了单独病灶病例中其敏感性降低至 70%以外，该方法的敏感性可达 98%，特异性可达到 100%[18-19]。抗原检测法也有相关报道，但是没有关于敏感性和特异性的对照数据。神经型囊虫病在有活虫体的时候，治疗需采用抗微生物药物[阿苯达唑(albendazole)或吡喹酮]，通常使用类固醇类药物改善死亡包囊所产生的炎症。在患有多个脑囊虫病变部位的患者中，2 种药物联合使用可提高治疗效果[27]。手术治疗只局限在单一的大病灶治疗或实施脑室-腹腔分流术时使用。抗原检测法可在患者抗微生物药物(antiparasitic treatment)治疗监测和随访时使用[19,28]。

(二)囊形包虫病(cystic hydatid disease)(细粒棘球绦虫)

在细粒棘球绦虫的生活史中，犬类是终宿主，而食草动物(主要是绵羊)作为中间宿主。感染是由食入犬粪便中散落的感染性虫卵并发育成幼虫(囊型棘球蚴)而引起的。人体包虫病是重要的疾病，需要通过昂贵的手术和医疗治疗。这种病仍然在大多数"旧"世界流行，特别是希腊、塞浦路斯、保加利亚、黎巴嫩、土耳其、其他一些欧洲国家、南美和非洲。目前，在阿拉斯加和美国也有散发的流行[29]。被感染的脏器通常是肝和肺，心、脑、骨骼和其他器官的感染很少见。肝感染的诊断通过超声或 CT，肺部的感染通过胸部 X 线或 CT 检查(图 148-2)。血清学抗体检测也是非常有用的方法，尽管相比其他寄生虫感染此种检测方法的敏感性较低，只能达到 80%～85%。在肝感染的病例中，血清学试验的敏感性比肺部感染病例的敏感性高。对于小包囊或未手术的病例采用抗微生物药物(阿苯达唑或阿苯达唑与吡喹酮联合使用)治疗；PARI(穿刺，吸液注射和再注射)是超声或 CT 引导下所进行的包囊内容物穿刺和取样的方法；也可通过腹腔镜或开放性手术取样[30-31]。包囊内容物的渗出液能导致急性的过敏反应或周边组织的播散性感染。在某些患者中，包囊可能会自行溶解而不需要治疗[32]。

(三)泡型包虫病(alveolar hydatid disease)(多房棘球绦虫)

多房棘球绦虫的成虫寄生在终末宿主的小肠内，在北半球(包括欧洲、亚洲、日本、北美的阿拉斯加)通常是野生的食肉动物[33-34]。幼虫阶段感染啮齿类动物(常见中间宿主)。人类感染(引起

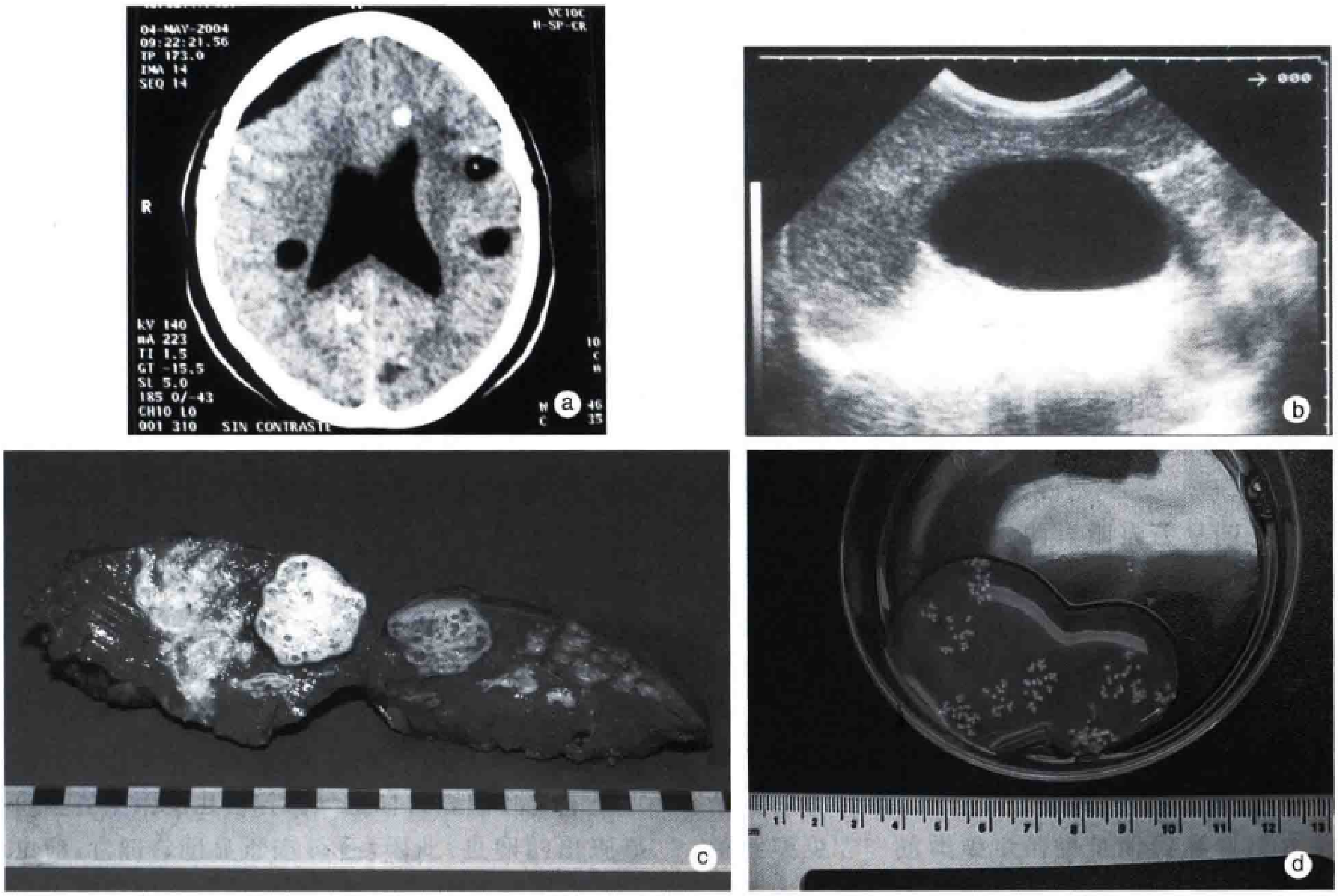


图 148-2 感染人体的绦虫幼虫

注：a. 人脑内的猪带绦虫囊尾蚴（神经型囊尾蚴病），通过非对比 CT 扫描的脑组织；b. 肝超声中的人体肝细粒棘球绦虫包囊（包虫病）（Enrico Brunetti，Universitàdi Pavia，Pavia，Italy）；c. 人体肝多房棘球绦虫病（K. Buttenschoen 和 P. Kern，University Hospital Ulm，Ulm，Germany）；d. 多头绦虫包囊壁上的多个头节，见彩插

泡型包虫病）是因食入包含六钩蚴的终宿主粪便污染的食物所致。泡型包虫病的主要表现类似于慢性发展的肝"恶性肿瘤"，幼虫随后侵入血管和胆管并转移扩散。病灶大小不一，可从小的点状病变到大型的浸润。因此，泡型包虫病在病理学和临床症状的发展上与囊形包虫病有着很大差异。这种疾病通常会影响 50 岁以上的人，其特点是慢性病程持续了数月或数年。临床表现与包囊肿瘤样病变的程度相关。除了体格检查以外，诊断常需要借助影像学技术，包括超声、CT、MRI 及血清学的辅助。治疗主要采取外科手术摘除。苯并咪唑的化疗仅限于病变残留及手术后或不能动手术的病变[35]。

（四）裂头蚴病（曼氏迭宫绦虫）

裂头蚴病（sparganosis）主要发生在东南亚地区，由于曼氏迭宫绦虫的续绦期幼虫因饮水或食入感染的肉类（蛙或蛇）侵入人体组织，或直接敷料而导致。最常见的寄生部位是在皮下组织和眼部。诊断依靠感染幼虫的病理学组织活检确诊[36]。

（五）多头蚴病（多头绦虫或锯齿状绦虫）

多头绦虫（*T. multiceps*）或锯齿状绦虫（*T. serialis*）以犬类为终宿主，绵羊为常见中间宿主（幼虫或多头蚴寄生）。多头蚴是一个包含透明液体的囊泡样结构，外有背膜而内部可见多个头节。感染的绵羊表现为失去平衡和持续的原地转圈的症状，病畜眩晕和跌倒（旋转病）。在人体较少引起多头蚴病。人体的感染主要在非洲大陆，但也有个别病例来自于法国、英国和南美、北美。多头蚴常侵入脑组织，引起致死性的病变。诊断

主要依靠多头蚴的典型幼虫膜和多个头节的特征确诊的[37-38]。

(六)囊尾蚴病(肥头绦虫)

肥头绦虫(*T. crassiceps*)是火狐体内的常见绦虫,幼虫常可在啮齿类动物的皮下组织和体腔内被发现。人体病例很少见,只出现在免疫缺失的患者(皮下、肌肉或眼部感染)[39-40]。

参考文献请扫二维码查阅

第149章 吸虫

MALCOLM K. JONES, JENNIFER KEISER, DONALD P. MCMANUS

（季萍 译；曹建平、陈家旭 审校）

本章重点介绍扁形动物门复殖（吸虫）目进化枝（新皮亚门：吸虫纲：复殖亚纲）（请参阅第135章）。寄生于人体的复殖目吸虫至少有70种。所有的吸虫都是体内寄生虫，寄生于人体的各组织内（表149-1～表149-3*）。大多数吸虫最突出的形态特征几乎都有两个圆形吸盘。其中一个是口吸盘，在口周围；另一个是腹吸盘，位于虫体1/3处，作为主要吸附器官[1]。复殖目吸虫的成虫在临床检查中很少被发现，因为它们是体内寄生虫，但可在使用驱虫药后或尸检时被观察到。除少数虫卵，它们有明显形态特征，因此，虫卵的出现是能够确定吸虫病诊断的，至少可以确定感染[2-3]。尽管吸虫成虫寄生在身体的不同部位，但复殖目吸虫的虫卵常随粪便排出。个别吸虫，如埃及血吸虫和少数其他血吸虫的虫卵随尿排出，并殖吸虫的虫卵可在痰中被观察到。

复殖目吸虫生活史的详细描述见图149-1*和图149-2。生活史模式有许多细微不同，但吸虫有两个主要模式（图149-1和图149-2），以血吸虫为例，主要模式是尾蚴直接侵入皮肤而感染人体，这种生活史模式的形成被称作水源性传播。很明显另外一种感染人的次要模式，见于食源性传播，此传播方式的寄生虫被称为食源性吸虫[4]。这类吸虫的感染阶段囊蚴随食物摄入人体（图149-2）。

表149-1 主要感染人体血吸虫的地理分布，中间宿主和虫卵形态

种类	疾病和地理分布	螺类宿主	药物	虫卵排泄部位和虫卵大小
曼氏血吸虫	肠道血吸虫病，感染人，有时会感染其他哺乳动物，疾病多分布在以下国家和地区：安哥拉、贝宁、博茨瓦纳、布基纳法索、布隆迪、喀麦隆、中非、乍得、刚果（布）、科特迪瓦、刚果（金），赤道几内亚、厄立特里亚、埃塞俄比亚、加蓬、冈比亚、加纳、几内亚、几内亚比绍、利比里亚、马达加斯加、肯尼亚、马拉维、马里、毛里塔尼亚、莫桑比克、纳米比亚、尼日利亚、卢旺达、塞内加尔、塞拉利昂、南非、斯威士兰、坦桑尼亚、多哥、乌干达、赞比亚、津巴布韦、埃及、利比亚、阿曼、沙特阿拉伯、也门、索马里、苏丹、安提瓜和巴布达、多米尼加、巴西、圣露西亚、波多黎各、委内瑞拉、苏里南以及瓜德罗普岛（法属省）、马提尼克岛（法属省）、蒙特塞拉特岛（英属）	双脐螺属（*Biomphalaria* species）。在非洲（亚洲），大部分在亚历山大双脐螺（*B. alexandrina*），凹脐双脐螺（*B. choanomphala*），菲氏双脐螺（*B. pfeifferi*），苏丹双脐螺（*B. sudanica*）。在美国：光滑双脐螺（*B. glabrata*）和其他2个种	吡喹酮，20 mg/kg，2剂或3剂量；社区计划通常40 mg/kg，单剂量	粪便（很少在尿液）；长140 μm，宽61 μm

*译者注：原著引用其他著作图和表格，未经原作者授权翻译，故此保留原图和表格

(续 表)

种类	疾病和地理分布	螺类宿主	药物	虫卵排泄部位和虫卵大小
日本血吸虫	肠道血吸虫病，感染人和许多其他哺乳动物：中国、印度尼西亚和菲律宾	湖北钉螺(*Oncomelaniahupensis*)，片山钉螺(*O. nosophora*)，台湾钉螺(*O. formasona*)，菲律宾钉螺(*O. hupensis subsp. quadrasi*)，林杜钉螺(*O. lindoensis*)	如上，社区计划通常 60 mg/kg，单剂量	粪便；长 85 μm，宽 60 μm
埃及血吸虫	泌尿生殖系统血吸虫病：阿尔及利亚、安哥拉、贝宁、博茨瓦纳、布基纳法索、布隆迪、喀麦隆、中非、乍得、刚果(金)、科特迪瓦、刚果(布)、埃及、埃塞俄比亚、加蓬、冈比亚、加纳、几内亚、几内亚比绍、伊朗、伊拉克、约旦、肯尼亚、黎巴嫩、利比里亚、利比亚、马达加斯加、马拉维、马里、毛里塔尼亚、毛里求斯、摩洛哥、莫桑比克、纳米比亚、尼日尔、尼日利亚、阿曼、沙特阿拉伯、塞内加尔、塞拉利昂、索马里、南非、苏丹、斯威士兰、叙利亚、多哥、突尼斯、乌干达、坦桑尼亚、也门、赞比亚、津巴布韦	水泡螺属(*Bulinus* species)。许多螺都属于水泡螺属[*Bulinus* (*Physopsis*)]或水泡螺亚属[*Bulinus* (*Bulinus*)subgenera of *Bulinus*]	和曼氏血吸虫治疗方法相同	尿液(很少在粪便)；长 150 μm，宽 62 μm
湄公血吸虫	肠道血吸虫病：柬埔寨、老挝和泰国	鼯鼠新羌螨(*Neotriculaaperta*)	和日本血吸虫治疗方法相同	粪便；长 66 μm，宽 57 μm
间插血吸虫(*Schistosoma intercalatum*)	直肠血吸虫病：喀麦隆、中非、乍得、刚果(金)、刚果(布)、赤道几内亚、加蓬、马里、尼日利亚、圣多美和普林西比	非洲水泡螺[*Bulinus* (*Physopsis*) *africanus*]，喀麦隆水泡螺[*Bulinus*(*Bulinus*)*camerunensis*]		粪便；长 176 μm，宽 66 μm
牛血吸虫(*S. bovis*)、柯拉松血吸虫(*S. curassoni*)、几内亚血吸虫(*S. guineensis*)、羊血吸虫(*S. mattheei*)、马氏血吸虫(*S. margrebowiei*)	非洲血吸虫病感染牛和野生动物；很少感染人	水泡螺属(*Bulinus* spp.)		
中华血吸虫(*S. sinesium*)、马来血吸虫(*S. malayensis*)	亚洲血吸虫病感染牛和野生动物；很少感染人			
澳毕吸虫(*Austrobilharzia*)、裂体吸虫(*Bilharziella*)、巨毕吸虫(*Gigantobilharzia*)、大毕吸虫(*Macrobilharzia*)、鸟毕吸虫(*Ornithobilharzia*)、毛毕吸虫(*Trichobilharzia*)	游泳者痒，尾蚴性皮炎，全球性分布	水泡螺属(*Bulinus*)，椎实螺属(*Lymnaea*)，织纹螺属(*Nassarius*)，膀胱螺属(*Physa*)，扁卷螺属(*Planorbis*)，沼泽椎实螺属(*Stagnicola*)		虫卵不能在人中找到，因为寄生虫在宿主体内未达到性成熟

表 149-2 寄生于人体肺和肝复殖目吸虫的地理分布，宿主和生活史[a]

科	种	寄生人体部位	疾病和地理区域	螺类宿主	囊蚴的来源	药物	虫卵
片形科（*Fasciolidae*）	肝片形吸虫（*Fasciola hepatica*）和巨片形吸虫（*F. gigantica*）	胆管	家畜片形吸虫病：全球分布人体片形吸虫病：澳大利亚、玻利维亚、中国、古巴、埃及、厄瓜多尔、法国、伊朗、秘鲁、葡萄牙、土耳其、越南	土蜗属（*Galba*）/椎实螺属（*Fossaria*）（肝片吸虫）；萝卜螺属（*Radix* spp.）（巨片形吸虫）	植物（湿草，水芹，薄荷水，半水栖蔬菜），受污染的水	三氯苯达唑，10 mg/kg（在严重的病例中连续服用2天）	粪便；长 130～150 μm，宽 60～85 μm（肝片吸虫）；长 160～190 μm，宽 70～90 μm
后睾科（*Opisthorchidae*）	华支睾吸虫（*Clonorchis sinensis*）、麝猫后睾吸虫（*Opisthorchis viverrini*）、猫后睾吸虫（*O. felineus*）	胆管	后睾吸虫病/华支睾吸虫病：苏联、柬埔寨、韩国、老挝等国家，中国的大陆和台湾地区，泰国、越南	华支睾吸虫：各种淡水螺[涵螺属（*Alocinma*）、水泡螺属（*Bulinus*）、沼螺属（*Parafossarulus*）]；麝猫后睾吸虫和猫后睾吸虫：豆螺属（*Bithynia*）和相关属	许多种（>100种）淡水鱼	吡喹酮 25 mg/kg 每天3次，连续服用1～2天	粪便；华支睾吸虫，长 23～35 μm，宽 10～25 μm；麝猫后睾吸虫和猫后睾吸虫，长 30 μm，宽 12 μm
后睾科（*Opisthorchidae*）	瓜亚基后睾吸虫（*O. guayaquilensis*）	胆管	后睾吸虫病：亚洲	未记入	鱼		
后睾科（*Opisthorchidae*）	对体吸虫（*Amphimerus*）	胆管	后睾吸虫病：南美洲	未记入	鱼		同上
隐孔科（*Troglotrematidae*）	非洲并殖吸虫（*P. africanus*）、卡利并殖吸虫（*P. caliensis*）、异盘并殖吸虫（*P. heterotremus*）、会同并殖吸虫（*P. hueitungensis*）、克氏并殖吸虫（*P. kellicotti*）、墨西哥并殖吸虫（*P. mexicanus*）、宫崎并殖吸虫（*P. miyazakii*）、斯氏并殖吸虫（*P. skrjabini*）、双侧宫并殖吸虫（*P. uterobilateralis*）、卫氏并殖吸虫（*P. westermani*）	肺部囊肿，体腔和脑	肺吸虫病：喀麦隆、中国大陆和台湾地区、哥伦比亚、哥斯达黎加、科特迪瓦、厄瓜多尔、赤道几内亚、加蓬、危地马拉、洪都拉斯、印度、印度尼西亚、日本、老挝、利比里亚、马来西亚、墨西哥、尼泊尔、尼加拉瓜、尼日利亚、朝鲜、巴拿马、巴布亚新几内亚、秘鲁、菲律宾、波兰、西伯利亚东南部、萨摩亚、韩国、斯里兰卡、泰国、委内瑞拉、越南、北美地区	有盖的螺：短沟蜷属（*Semisulcospira*）、粒蜷属（*Thiara*）、钉螺属（*Oncomelania*）	淡水蟹，虾	三氯苯达唑 20 mg/kg，吡喹酮 25 mg/kg 每天3次，连续服用1～2天	粪便、痰；种类不同大小不同
双腔科（*Dicrocoeliidae*）	双腔吸虫（*Dicrocoelium species*）	胆管	双腔吸虫病：人体病例：捷克、肯尼亚、尼日利亚、俄罗斯、沙特阿拉伯、索马里、西班牙、美国	陆地螺：柄眼目（*Stylommatophora*）	昆虫（蚂蚁）	吡喹酮？	粪便，胆管；长 38～45 μm，宽 22～30 μm；棕黄色，卵壳厚，内含胚胎，有卵盖

表 149-3 Geographical distribution, intermediate hosts, and egg morphology of digeneans of the human gastrointestinal tract[a,b]

Family	Genera	Disease and geographic area	Snail host(s)	Source of metacercariae	Human infection	Drug	Egg
Echinostomatidae	Acanthoparyphium, Artyfechinostomum, Echinochasmus, Echinoparyphium, Echinostoma, Episthmium, Euparpyhium, Himasthla, Hypoderaeum, Isthmiophora, Paryphostomum	Echinostomiasis: China, Egypt, Hungary, India, Indonesia, Italy, Japan, Korea, Malaysia, North and SouthAmerica, Philippines, Romania, Russian Federation, Siberia, Singapore, Taiwan, Thailand	Family Viviparidae, Planorbidae	Fish (loach), molluscs (snails, clams), amphibians (tadpoles, frogs)	Focal; prevalence, 5-44%	P (25 mg/kg)	Feces: 100× 65~70 μm
Fasciolidae	Fasciolopsis	Fasciolopsiasis: Bangladesh, Cambodia, China, India, Indonesia, Korea, Laos, Pakistan, Taiwan, Thailand, Vietnam	Family Planorbidae	Water plants (water chestnut, caltrop, lotus roots, bamboo), other aquaticvegetation	Widespreadbut focal; prevalence, up to 60% inchildren	P, 15~40 mg/kg; MB, 100 mg/kg	Feces, 130~140× 80~85 μm
Heterophyidae	Appophalus, Centrocestus, Cryptocotyle, Diorchitrema, Haplorchis, Heterophyes, Heterophyopsis, Metagonimus, Phagicola, Procerovum, Pygidiopis, Stellantchasmus, Stichodora	Metagonimiasis orheterophyiasis: Balkans, Brazil, China, Egypt, Greenland, Indonesia, Israel, Japan, Korea, Philippines, Russia, Spain, Sudan, Taiwan, Tunisia, Turkey, U. S.	Family Thiaridae, Littoriniidae	Fish (freshwater or brackish, carp, mullet, cyprinoids), crustaceans (shrimp)	Low prevalence, but common; cases withheavy infectionsof clinical significance	P, 10~20 mg/kg	Feces: 20~35× 12~20 μm
Paramphistomidae	Gastrodiscoides, Gastrodiscus, Watsonia	Gastrodiscoidiasis: China, Guyana, India, Myanmar, Malaysia, Pakistan, Philippines, Russia, Thailand, Vietnam	Helicorbus	Squid, plants, crustaceans (crayfish), amphibians (frogs, tadpoles)	Rare, focal	NR	Feces: 127~169 × 62~75 μm
Troglotrematidae	Nanophyetus salmincola andN. schikhobalowi	Nanophyetiasis: Russia, U. S.	Oxytremasilicul	Fish (salmon, trout)	Rare	P	64~97× 34~55μm

[a] Modified from reference 79; used with permission.

[b] Abbreviations: NR, not recorded; MB, mebendazole; P, praziquantel.

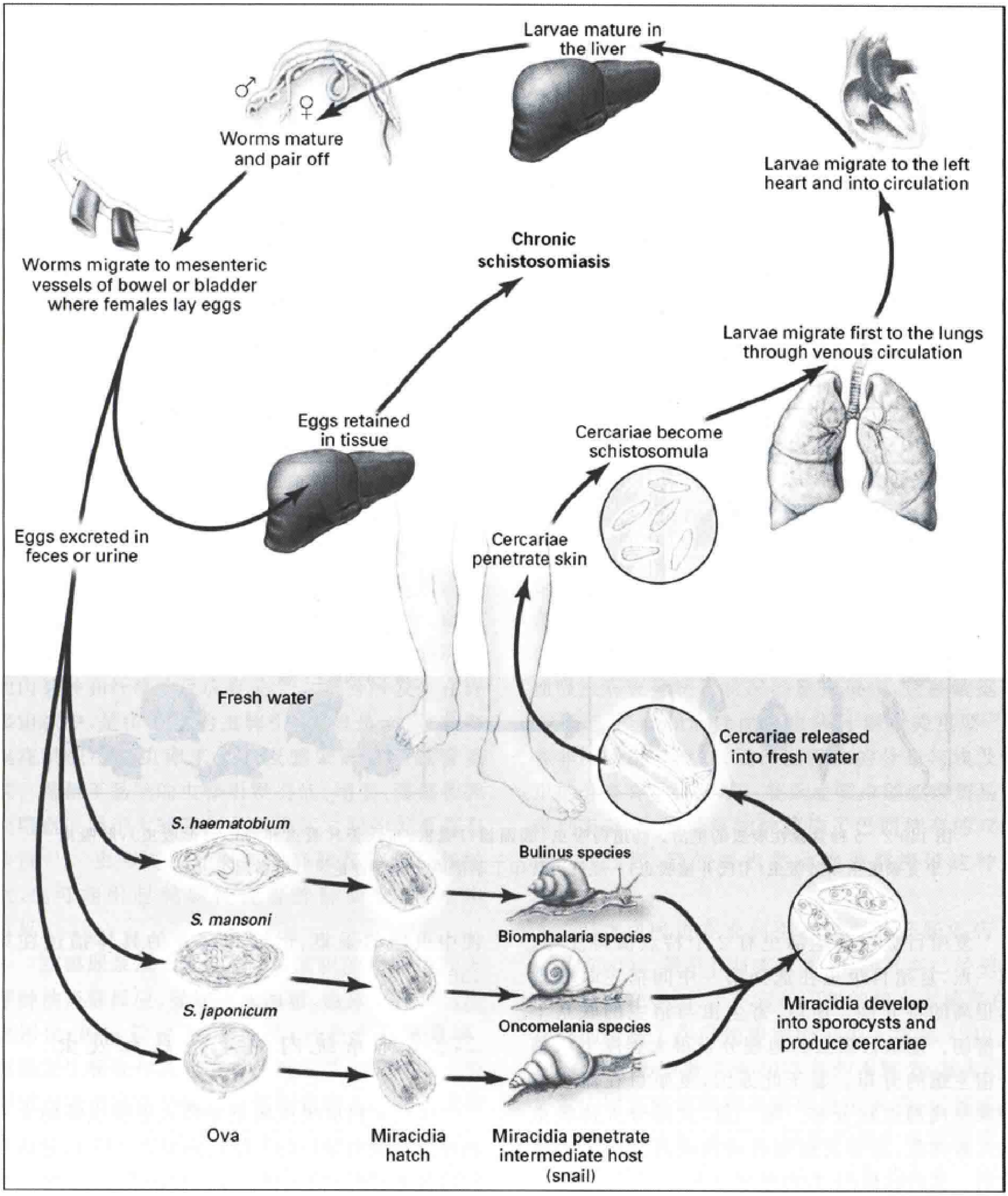


图 149-1 Five species of Schistosoma are known to infect humans. Infection with S. mansoni, S. japonicum, S. mekongi, or S. intercalatum adults occurs in mesenteric veins; S. haematobium adults infect the vesicle plexus. Humans are infected after cercarial penetration of the skin. After penetration, the cercariae shed their bifurcated tails, and the resulting schistosomula enter capillaries and lymphatic vessels en route to the lungs. After several days, the worms migrate to the portal venous system, where they mature and unite. Pairs of worms then migrate to the site of patent infection. Egg production commences 4 to 6 weeks after infection. Eggs pass from the lumen of blood vessels into adjacent tissues, and many then pass through the intestinal or bladder mucosa and are shed in the feces or urine (see the text). In freshwater, the eggs hatch, releasing miracidia that, in turn, infect specific freshwater snails (Table 1). Reprinted from the New England Journal of Medicine (41) with permission.

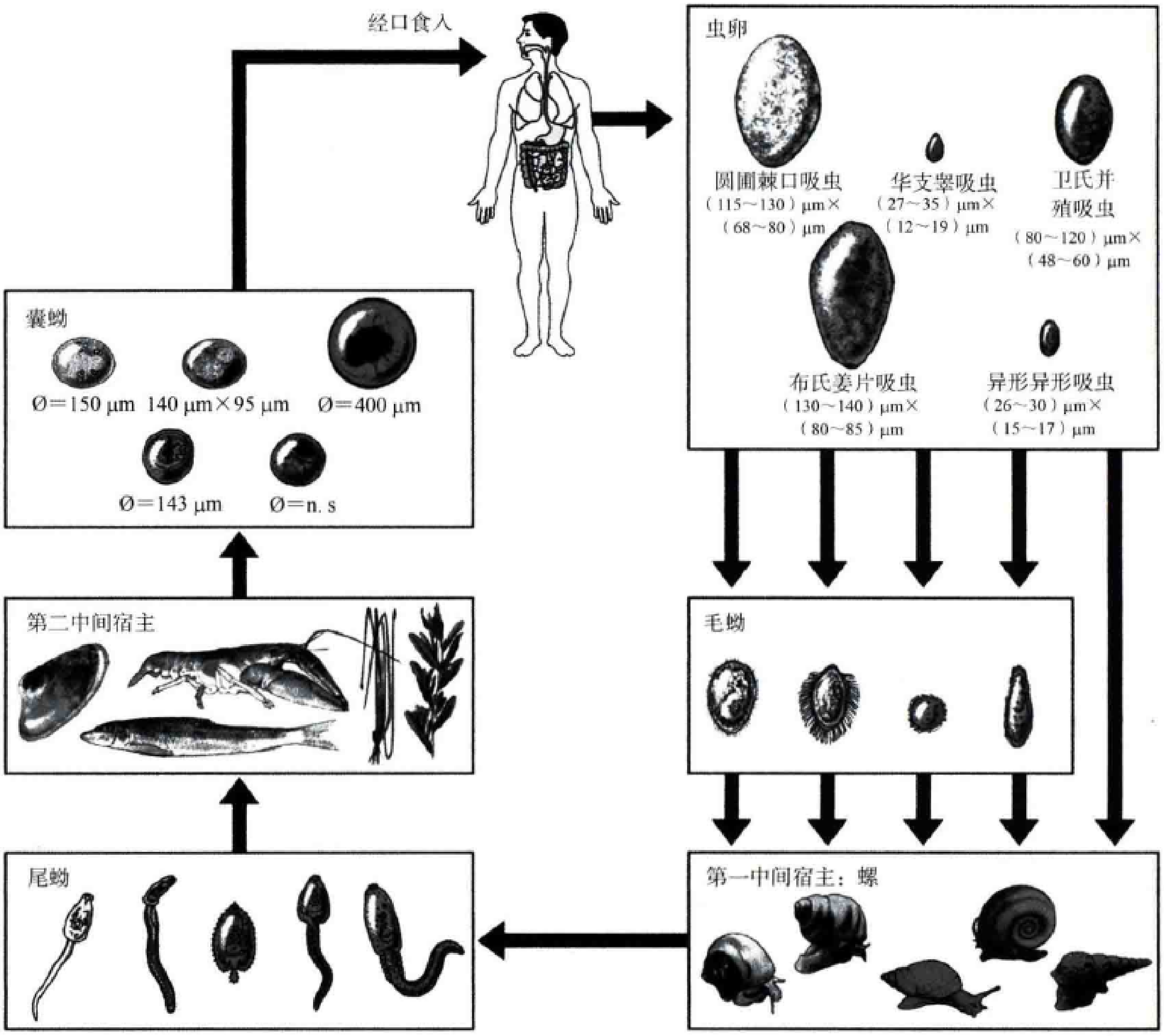


图 149-2 5 种食源性吸虫的生活。肠道内吸虫(圆圃棘口吸虫、布氏姜片吸虫和异形异形吸虫)，肝吸虫(华支睾吸虫)，肺吸虫(卫氏并殖吸虫)。经许可转印于临床微生物学评论[50]，见彩插

复殖目吸虫的生活史有 2 个特点值得注意。第一点，复殖目吸虫在选择第一中间宿主时表现出很高的特异性。所以，寄生虫与宿主的联系十分密切。复殖目吸虫的地理分布很大程度上依赖于宿主螺的分布。鉴于此原因，复殖目在流行的国家呈局部点状分布。第二点，大部分人体吸虫是人畜共患，需要其他哺乳动物或禽类宿主出现在同一流行区域内，以持续感染人。

一、采集、运输和储存

如上所述，在临床检查中很少发现吸虫的成虫，但可在使用驱虫药后被观察到。使用标准操作程序对其样本进行固定以备之后的形态学、血清学或分子研究[5]。用于诊断粪便、尿和痰的样本取决于所在的部位和其他临床症状。在人粪便中虫卵的采集、运输和储存的具体描述在第 136 章。

二、循环系统内的复殖目血吸虫

吸虫亚目血吸虫属是导致人患吸虫病的主要病原。血吸虫导致的人体疾病见表 149-1，包括它们的分布、螺类宿主和治疗。目前有 7.79 亿人处于血吸虫感染的风险中。来自 76 个国家的 2.3 亿人感染了血吸虫病，其中 85%的病例来自非洲撒哈拉地区[6]，其中 1.2 亿人有发病症状，而 2000 万人严重感染。

1. 病原描述 成虫寄居在人体血管内，主要在肠系膜静脉或膀胱静脉丛。成虫为雌雄异体，细长的雌虫栖息于由雄虫虫体向两侧延伸并向腹面卷曲形成的半封闭抱雌沟内。成虫的形态描述

和分类学主要在科研的其他报告中总结[1]。感染人类的血吸虫通常有5种，其中有3种最为重要：曼氏血吸虫（*S. mansom*）、日本血吸虫（*S. japonicum*）和埃及血吸虫（*S. haematobium*）（表149-1）。人和动物的寄生虫物种间的杂交在非洲[7]及南欧成为日益严重的问题[8-9]。

2. 临床表现 尾蚴性皮炎可见于血吸虫病，但更常见于感染禽类的血吸虫（表149-1）和梭型血吸虫（*S. spindale*）。来自于美国、南美和欧洲的潜在致病因素丰富多样，导致人体尾蚴性皮炎的物种数量很可能被低估[10]。

急性毒性血吸虫病（片山热）可以出现在任何血吸虫种的感染中，但免疫力低下的个体更为明显类似于血清疾病表现[11]。

虫卵（图149-3）由雌虫在血管中产生，必须穿过血管内皮、肠道或膀胱黏膜排出宿主体外。寄居在肠系膜静脉的血吸虫，虫卵可穿过肠道或直肠壁，然而埃及血吸虫的虫卵可穿过膀胱壁。所有的血吸虫虫卵都会滞留于组织中。因此，血吸虫病的慢性影响与成虫感染部位、滞留虫卵部位的肉芽肿和纤维化反应有关[12]。肉芽肿发生在许多组织中，是由滞留的虫卵引起；但是，大部分聚集在组织中的虫卵来自成虫感染部位的脉管系统。滞留于肠壁的虫卵引发炎症、增生、溃疡和粪便隐血。对于大肠癌与血吸虫病之间的关系仍有争议[13]。虫卵进入肝引起门静脉高压和肝脾肿大，也可能引起脆弱性食管静脉曲张，腹水也常见。

在泌尿系统血吸虫病中，沉积的虫卵引起肉芽肿性炎症反应，导致排尿困难、血尿、蛋白尿、膀胱钙化、输尿管梗阻、肾绞痛、肾积水和肾衰竭。可能发生膀胱和其他组织的继发性细菌感染。有报道血吸虫感染和膀胱鳞状细胞癌之间有一定的联系[14]。对男性和女性生殖器的影响比较常见，埃及血吸虫感染在1/3的女性中可引起生殖器疾病，导致外阴、会阴疾病及输卵管性不孕，并且可能增加感染艾滋病病毒的风险[15]。

3. 流行病学、传播与预防 血吸虫生活史仅涉及2个宿主（图149-1），每个血吸虫物种特有的淡水螺和终宿主人（或人畜共患病的情况，家养和野生哺乳动物作为终宿主），淡水中的媒介螺是传播必不可少的因素。

所有的人体血吸虫都以淡水螺为中间宿主。人体通过接触感染性幼虫——尾蚴污染的淡水而感染（图149-1）。尾蚴经皮肤进入人体。

在流行区，导致血吸虫病传播的因素包括宿主螺的生物学分布和种群动态、淡水被粪便或尿污染的程度，以及人与受污染的水体的接触程度，某些流行区的大型水坝的建设导致传播动力学的改变[16]。一个有趣的假设是水坝改变了在缺钙淡水环境中通常以媒介宿主为食的十足目甲壳纲甲壳物（对虾和小虾）的分布[17]。中国三峡大坝对日本血吸虫的影响还不清楚[18]，尽管大坝对生态的长期影响需要长期持续地监测，但有证据表明它可能正在加速长江中下游消除血吸虫病传播的进程[19]。

（1）肝脾血吸虫病：曼氏血吸虫是研究最为广泛的血吸虫，主要分布在非洲撒哈拉地区、埃及、中东、马达加斯加、南美东部的国家和加勒比的一些岛屿（图149-1）。在捐赠的吡喹酮协助下，大规模的控制项目正在撒哈拉以南非洲进行，风险地图和描述血吸虫病地理分布的地理分析系统也为此提供了支持[20]。另一方面，拉丁美洲国家关于血吸虫病流行病学状况的数据很少，这些数据对于制定、控制和消除血吸虫病计划至关重要[21]。在非洲的许多地方，曼氏血吸虫的分布与埃及吸虫的分布有重叠区域。曼氏血吸虫随奴隶贸易被带到南美，在那里该物种感染了巴西特有的双脐螺。在巴西，已知啮齿类动物种群携带这种寄生虫。

日本血吸虫在亚洲引起重要的肝肠疾病[22]（图149-1）。最早在日本发现，但在日本已经被消除。目前在中国、菲律宾和印尼的较小区域存在。持续的控制工作已使中国的感染人数从1949年的约1200万人减少到2013年的不到20万人[23]。尽管中国在疾病控制方面取得了成功，但该疾病在菲律宾仍然根深蒂固，那里的寄生虫感染是由于冲突和地理原因导致卫生部门无法开展实施防控措施。日本血吸虫病是一种人畜共患病，特别是反刍动物，如水牛、牛和山羊都是其维持生活史的重要保虫宿主[24]。

湄公血吸虫（*S. mekongi*）在湄公河流域呈高度点状分布，老挝和柬埔寨也是流行疫点[25]。虽然最初认为湄公血吸虫是日本血吸虫的一个亚种，该血吸虫的形态特征、病理变化及生活史与日本血吸虫是明显不同的。尽管这种疾病仍然保持

较高的发病率并有新的感染发生，但在柬埔寨和老挝流行省区的持续大规模化疗已经能够控制该疾病[26]。该寄生虫仍然是该地区持续关注的问题，最近对居住在湄公河岛上的人群进行的一项调查显示，22%的人感染了湄公血吸虫，其中约4%的人患有严重的血吸虫病[27]。此外，该疾病在9岁以下的儿童中发病率很高。与人接触密切的动物是人畜共患病的重要来源。

间插血吸虫（*S. intercalatum*）引起非洲的人体直肠血吸虫病。该物种有两个地理株（目前被认为是不同的物种[28]），喀麦隆株和刚果民主共和国株，两者均显示出高度聚集的分布[22]。该寄生虫属于埃及血吸虫种群，其特点是虫卵的末端有一个小棘（图 149-3）。

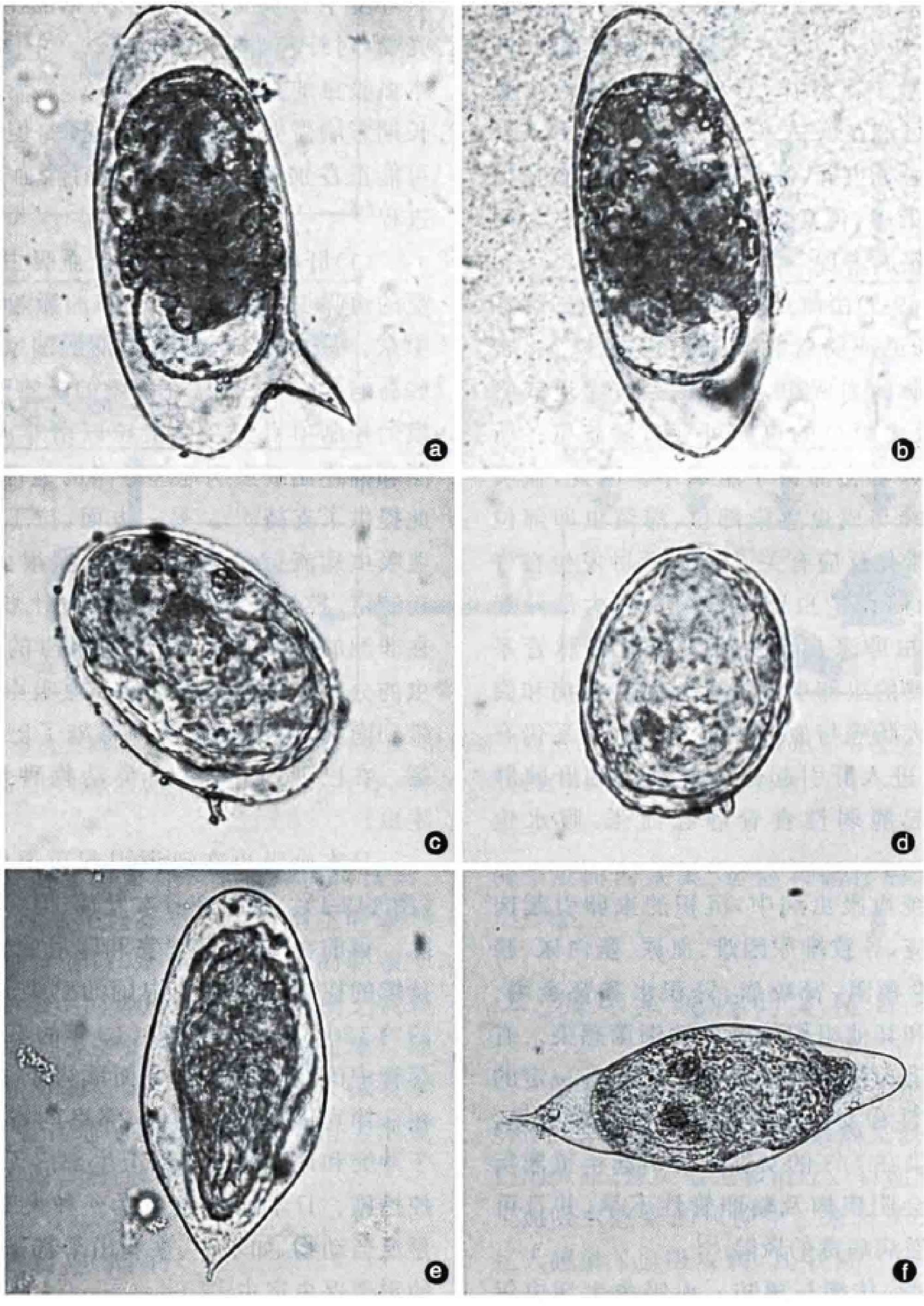


图 149-3 血吸虫虫卵（放大倍数×600）

注：a. 曼氏血吸虫；b. 曼氏血吸虫虫卵（典型侧棘未见）；c. 日本血吸虫；d. 湄公血吸虫；e. 埃及血吸虫；f. 间插血吸虫（c 和 e 经许可转印自参考文献[30]），见彩插

（2）泌尿生殖系统血吸虫病：埃及血吸虫是泌尿系统血吸虫的唯一病原，该虫种多分布在非洲大陆、马达加斯加和中东[1,22]（表149-1）。成虫在膀胱神经丛中生活，虫卵通过膀胱壁，随尿排出。

近年来，许多报道表明血吸虫具有能够与其他种类的血吸虫杂交的能力。埃及血吸虫和牛血吸虫之间及几内亚血吸虫和间插血吸虫之间的杂交已被证实或提出。形成杂交种和不同埃及血吸虫的种群具有对宿主螺的要求不同，特别是在流行病学方面，这仍然是持续控制这些寄生虫的一个重要问题[29]。

4. 显微镜检查 粪便或尿中的血吸虫虫卵（图149-3）[30]是血吸虫病的确诊依据。肝脾血吸虫病可通过光镜观察粪便盐水涂片样本中有无虫卵进行诊断。最近，对手机的摄像头进行了测试，以便对粪便和尿中的虫卵进行快速显微可视化检测[31]。对于沉淀物和浓集物进行福尔马林固定是很有用的，特别是在患者排出少量虫卵的检测中。孵化检测中，粪便悬浮在无氯的水中，容器避光，只在表面有光源，该方法已被用来检测活动的毛蚴。在慢性血吸虫病和有典型临床表现但尿和粪样是阴性的患者中，膀胱或直肠黏膜活检可对诊断有帮助。

改良加藤法粪便涂片可用于现场诊断和粪便虫卵定量。改良加藤法的理论敏感阈值是每克粪便24个虫卵[32]，但是，由于每日虫卵排出数量的变化，以及虫卵在粪便中分布不均匀可能导致计数的不一致[33]。本文介绍了直接观察肝肠血吸虫病虫卵的新方法，其中包括生理盐水梯度法，FLOTAC技术和Helmintex方法[34-36]。Helmintex方法利用磁场中虫卵与磁珠之间的特殊表面相互作用来提供对虫卵的高敏感性纯化。在巴西使用时，Helminth尚未获得美国FDA的批准。

沉淀法或浓集法是检测尿中埃及血吸虫虫卵最有用的方法。除此之外，对于尿中血液、蛋白和嗜酸性粒细胞的检测也可使用，但并不是特异性的，仅指示有感染的可能[37]。便携式超声对于组织病理学损伤的评估非常有用。在流行地区人群调查问卷的使用可帮助了解日本血吸虫和埃及血吸虫的感染情况，但是对于曼氏血吸虫使用该方法时可能会导致对流行率的低估[38]。

5. 血清学检查 已经开发出多种血清学工具来诊断血吸虫病的三种主要病原体[39]。标记和方法是多种多样的，主要针对尾蚴、卵和成虫等3种抗原。血清学检查对于从流行地区返回的旅行者或居住在已消除血吸虫病地区患者的血吸虫病诊断最有价值[36]。在疾病的早期阶段和虽然虫子已被药物杀死，但特异性抗体持续存在的情况，血清学试验在敏感性和特异性方面都有一定的局限性[36]。如果将血清学用作诊断测试，建议进行两次独立的试验以提高敏感性[39]。在最近的一项研究中，Cai和他的同事[40]表明，将两种重组日本血吸虫蛋白（虫体肠上皮分泌的脂质结合蛋白鞘脂蛋白SjSAP4和表面暴露的四跨膜蛋白的外源性环Sj23-LHD结合在一种抗体酶联免疫吸附试验（ELISA）中，有可能提供一种具有高敏感性和特异性的诊断工具，能够鉴定出少量虫荷的患者，且其检测阈值低于当前粪便或循环抗原的检测阈值。其他间接检测包括外周血嗜酸性粒细胞增多症、贫血、低白蛋白血症、尿素和肌酐水平升高及高球蛋白血症[37,41]。

6. 直接抗原检测 血吸虫病患者尿中两种抗原（循环的阳极和阴极抗原）的检测，已成为血吸虫病尤其是曼氏血吸虫病诊断的靶标。用于检测循环阴极抗原的侧向流动试剂盒有市售，并已广泛用于非洲和巴西，但未获得FDA批准。虽然该方法明显比Kato-Katz粪便涂片敏感但仍有一些局限，特别是在感染的追踪或临界结果的解释上[42]。尽管如此，快速检测由于其快速性和更高的准确性而在流行病学调查中被广泛接受。靶向循环性阳极抗原的流动分析法仍在开发中，但已证实在低感染度和接近消除环境中，对日本血吸虫和埃及血吸虫病诊断敏感性较好[36]。

7. 核酸检测 在流行病学调查中，分子检测方法已用于许多研究中以其高敏感性检测血吸虫病感染[36,43]。特别是实时PCR的问世。尽管通常使用线粒体序列（日本血吸虫和曼氏链球菌的*cox*2和*nad*6基因，日本血吸虫的*nad*1和*nad*2，以及血吸虫的*cox*1)，但各种目的序列仍被使用[23,43]。从血浆、血液、唾液和尿非细胞样本中检测血吸虫DNA的兴趣不断提高[44-45]。最近，使用来自实验感染宿主的血液进行针对高重复性121bp序列的环介导的等温扩增（LAMP）的微流

控试验[46]。还开发了LAMP方法来监测血吸虫感染的钉螺,分子检测已被证明具有高度的敏感性,适用于低感染环境下的调查,但是仪器和试剂的相对成本仍然是使用分子工具进行即时诊断的问题。

8. 治疗 吡喹酮是治疗血吸虫病的首选药物。该药物已在许多国家用于大规模治疗中,其中的部分因素得益于与该药生产相关的成本降低。尽管如此,驱虫药还是有一定的局限性,因为它仅对成虫阶段有效[47],并且不能预防随后的感染。吡喹酮会破坏细胞内的钙转运,并引起寄生虫严重的肌肉收缩。尚未在临床上观察到对吡喹酮的广泛耐药性,但是该药物在大规模治疗中的应用可能会导致出现新的耐药形式[48]。吡喹酮注册为5岁以上的儿童使用。但是,为了防止幼儿发病,正在努力为学龄前儿童确定正确的剂量[49]。此外,目前正在开发用于婴儿的吡喹酮口服分散片或其活性对映异构体(1-吡喹酮)。

在体内外研究及概念验证研究中已经测试了多种化合物,但是没有明显的替代吡喹酮的临床替代品。在实验室研究中已经确定了几种有希望的新药,但是还需要十年时间才能进入市场[48]。

三、食源性吸虫

这里提到的所有其他复殖目吸虫代表了不同的分类,它们通过摄入生的或未煮熟的食物来感染人体(图149-2;表149-2和表149-3)。这些食源性吸虫对人类健康的影响很大。大约1/7的人口有感染的风险,超过5600万人被感染[50]。这些寄生虫是人畜共患的,控制人体感染的主要流行病学特征包括中间宿主螺的分布、人的食物消费行为、是否存在人畜共患病宿主及人或动物排泄物对水的潜在污染[50]。

呼吸系统:并殖吸虫

并殖吸虫病由多个虫种引起,遍及亚洲、非洲和美洲(表149-2)。斜睾(吸虫)目和隐孔(吸虫)科进化枝的并殖吸虫属非常多样化,大多数物种分布在东南亚。该群体的分类学因遗传多样性和持续的物种形成而变得复杂[51]。所有虫种都是人畜共患的,感染食肉动物、猪和啮齿动物。在北美,人畜共患的克氏并殖吸虫主要感染食用甲壳类动物的哺乳动物[52]。感染人的最常见物种是卫氏并殖吸虫,它发生在中国和其他东南亚国家。

1. 病原描述 并殖吸虫成虫寄生于肺部,诱导包囊的形成,吸虫大而多肉,长8~16 mm和宽4~8 mm。这些寄生虫的生物分类信息在其他地方介绍[53]。

2. 临床表现 约有2070万人患有并殖吸虫病,另有2.93亿人处于感染风险中[54]。感染症状包括发热伴有干咳,有时甚至是含有虫卵血痰、胸痛、呼吸困难和支气管炎,症状有时类似于肺结核。常见外周血嗜酸性粒细胞增多。吸虫可导致上皮囊肿的形成,直径约1 cm,并随着时间的延长而钙化。该虫也可寄生在肺外组织,当寄生在脑部会引起严重的并发症[55]。

在北美,凯氏疟原虫在美国中西部的北部,特别是密苏里州和加拿大发生[52]。尽管人类感染很少见,但依然可能很严重。最近有2例由于克氏并殖吸虫感染导致嗜酸性粒细胞性脑膜炎[55]。在该病流行地区的脑膜脑炎病例中应考虑并殖吸虫病的脑膜炎。

3. 流行病学、传播与预防 图149-2和表149-2显示了并殖吸虫的生活史周期。在大约30个虫种中,有9个被记录为人寄生虫。虫卵穿过肺,并与痰一起转移到支气管。虫卵可能随痰咳出或被吞入然后被粪便排出。第一中间宿主是淡水螺。摄入未煮熟或腌制的淡水螃蟹或虾会引起人感染[56],但是食物加工前未洗手和受污染的餐具也可能是人感染的来源。野猪和鹿也可以充当转续宿主。摄入后,未成熟的吸虫穿透肠壁,并通过体腔迁移到肺部。

4. 显微镜直接检查 并殖吸虫病的诊断主要依赖于对痰、粪便或胸腔积液中卵的检测[30,56](图149-4)。但是,在排泄物中观察到虫卵之前的几周或几个月,临床症状可能已经出现,因此很难通过检测虫卵来诊断[52]。咳嗽并伴有铁锈色痰提示肺部有感染,因此铁锈色痰应该进行虫卵检测。围绕成虫形成的包囊在X线下呈典型的环形或结节。与肺结核的鉴别诊断需要直接观察到虫卵来确诊。

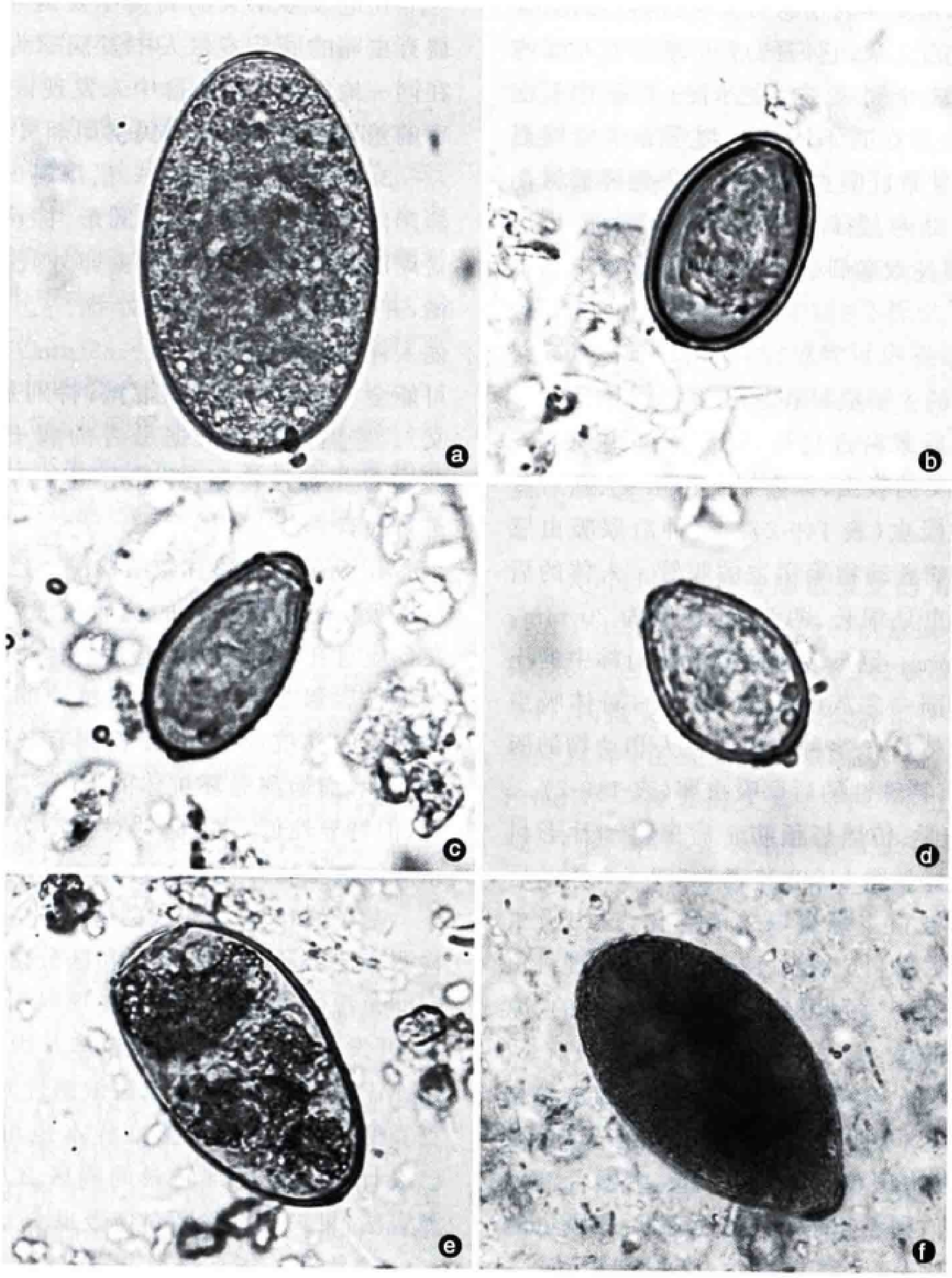


图 149-4 吸虫虫卵

注：a. 布氏姜片吸虫（放大倍数×500）；b. 异形吸虫（放大倍数×1500）；c. 华支睾吸虫（放大倍数×1500）；d. 麝猫后睾吸虫（放大倍数×1500）；e. 卫氏并殖吸虫（放大倍数×600）；f. 鲑隐孔吸虫（放大倍数×750）（b 和 d 经过允许转引自参考文献[30]），见彩插

5. 血清学试验和核酸检测 血清学试验包括采用相对分子质量为 32×10^3 和 35×10^3 抗原或虫体卵黄铁蛋白作为抗原进行的 ELISA 检测[37]。对于克氏并殖吸虫，已开发出使用寄生虫抗原的蛋白质印迹分析[57]。胸膜炎伴随嗜酸性粒细胞增多和 IgM 抗体滴度高可能是并殖吸虫病的指征[58]。已经测试了包括常规 PCR，实时 PCR 和 LAMP 多种诊断并殖吸虫的分子方法[57]，尚未对方法进行系统比较。

6. 治疗 目前，世界卫生组织推荐的治疗方法是吡喹酮口服给药，给药剂量是 25 mg/kg，连续给药 2～3 天，三氯苯达唑以 10 mg/kg 或 20 mg/kg 体重分两次给药可作为治疗的选择[59]。

四、肝内吸虫

片形科、后睾科、双腔科的吸虫至少有 13

种[60](表 149-2),更多的信息可参考《柳叶刀》上发表的关于吸虫的文章,它们的成虫寄生于人体的肝和胆管。这三个科系彼此之间的关系并不密切,其分类学差异在其不同的生物学和生命周期中有所体现。导致肝吸虫感染的这几类科系将在下面分别单独讨论,先讨论后睾科然后讨论片形科,最后简短描述双腔科。

(一)后睾科

人肝吸虫的主要成员在现代生物物种分类中属于后睾目和后睾科进化枝,亚洲地区出现的三种具有重要意义的吸虫,即麝猫后睾吸虫、猫后睾吸虫和华支睾吸虫(表 149-2)。三种后睾吸虫感染了人和其他哺乳动物等宿主的胆管。人体的后睾科吸虫的成虫是细长、两头尖,长度为 20 mm,宽度为 2～4 mm。厄瓜多尔北部沿海雨林中的土著社区发现了同一家族的第四个虫种,对体吸虫属暂未被描述[61]。该物种也生活在人和动物的胆管中,产出具有特殊性的后睾吸虫卵(表 149-2)。

1. 流行病学、传播与预防 后睾科和片形科的生活史信息详见图 149-2 和表 149-2。人体的后睾吸虫卵必须被宿主螺摄取才能孵化,这在吸虫里很少见。在后睾科中(图 149-2),囊蚴在鲤科鱼的肌肉中成囊[60]。个体感染是由于食入生的、凉拌的或未煮熟的鱼[3]。

2. 临床表现 疾病严重程度在不同的虫种和感染强度中是不同的[3]。华支睾吸虫有 1500 万人感染,分布在中国(包括中国香港、中国台湾)、印度、朝鲜、西伯利亚和越南[62]。麝猫后睾吸虫的感染有 1000 万人,主要在泰国、老挝和柬埔寨。猫后睾吸虫普遍分布在北欧和亚洲,150 万人感染[50]。这 3 种吸虫都生活在胆管内,被认为以胆管上皮细胞为食。轻度感染通常无症状,但重度感染可诱发疾病。症状通常表现在急性感染期,包括发热、腹痛、肝炎样症状和嗜酸性粒细胞增多。许多无症状的肝胆异常与感染相关[63]。华支睾吸虫的严重感染可能导致梗阻性黄疸、肝硬化、胆管炎、胆囊炎、胆汁性腹膜炎、胆道梗阻、肝内胆管结石的形成、胆石症、胆管和肝脓肿、胰腺炎和肝炎。华支睾吸虫和麝猫后睾吸虫感染最严重的症状是胆管癌或恶性胆管癌。最近的俄罗斯联邦机构的证据表明猫后睾吸虫感染与胆管癌之间存在关联,且这三种物种均具有致癌潜力[64]。

在厄瓜多尔人的粪便中发现后睾吸虫卵,粪便有虫卵的厄瓜多尔人中发病率为 15%～34%。在同一地区的其他人群中未发现该种虫卵。患病率的差异归因于当地居民食用烟熏鱼[61]。

3. 显微镜直接镜检 后睾科的虫卵(图 149-4)产出时包含胚蚴,呈卵圆形,棕黄色有卵盖,卵盖周围的卵壳形成肩峰,虫卵外壳表面可能会粗糙,并且在卵盖对侧端有小疣[60]。虫卵比许多其他人体复殖目吸虫小,20～35 μm。后睾科的虫卵可能会与其他吸虫虫卵混淆,特别是异形科(见下文)。鉴别诊断可依据患者的病史进行,通过甲醛-乙醚沉淀法检测,并对用驱虫药治疗后的粪便进行检查。

4. 血清学试验和核酸检测 已开展对于麝猫后睾吸虫感染所进行的抗原试验,但大多数有交叉反应且在进行驱虫治疗后抗体持续存在[65]。采用麝猫后睾吸虫排泄/分泌抗原制备的单克隆抗体进行的粪抗原 ELISA 检测有较高的敏感性和特异性,而检测循环抗体的 ELISA 展现出高敏感性,但特异性低[37]。已针对检测方法来自厄瓜多尔对体吸虫属开发出 ELISA[66]。

基于线粒体[67]和核糖体序列[68],不同的 PCR 检测方法被开发用来检测和区分由后睾科感染引起的鱼源性人畜共患病和异形科引起的感染。最近,开发了以 8 个 *cox1* 线粒体基因序列为靶点的 LAMP 技术[69]。该测定法敏感性和特异性高,每克粪便有 10 个虫卵感染样本也可被检测出来。已设计出基于内部转录间隔区 2 序列的 LAMP 测定法,可灵敏地诊断对体吸虫[70]。

5. 治疗 华支睾吸虫病或后睾吸虫病的治疗依靠吡喹酮口服给药(医院中常用的给药剂量是 25 mg/kg,每天 3 次,连续服药 2 天;而在大规模治疗方案中,单剂口服给药的剂量是 40 mg/kg)。中国的驱虫药三苯双脒在治疗麝猫后睾吸虫和华支睾吸虫的感染中有很好的活性,因此,进一步的研究(包括剂量探索和药动学试验)已经展开[71]。

(二)片形吸虫科

1. 病原描述 片形吸虫病是大型寄生虫,由片形属的吸虫引起,主要感染食草哺乳动物,直到最近,片形吸虫病的人体感染是零星的。但据估计,目前有 61 个国家的大约 1700 万人受到感染,全球有 1.8 亿人处于危险之中。两种致病虫种,

即肝片形吸虫和巨片形吸虫在全球范围内分布于家养动物中，人被重点感染，人片形吸虫病被认为是地方性疾病[1,37,72]。

2. 流行病学、传播与预防 片形吸虫的囊蚴在半水生或湿蔬菜上附着，主要包括豆瓣菜、草、水薄荷或沙拉(图 149-2，表 149-2)，片形吸虫在家养动物中寄生的频率与人片形吸虫病的患病概率不相关。人片形吸虫病的低流行区包括法国(在诺曼底每 10 万人<3.1 个病例)和智利；高流行地区是秘鲁(在流行区感染率为 15.64%～34.2%)和玻利维亚(66.7%玻利维亚高原)[72]。大部分的高流行区是肝片吸虫的分布区。常见的人畜共患宿主是牛和绵羊，其他宿主如猪、马和大鼠可作为保虫宿主。儿童和青年人比成年人更容易感染，这暗示该病存在年龄依赖性的免疫[73]。

3. 临床表现 许多片形吸虫感染没有症状。急性疾病的发生是由于寄生虫通过肝实质迁移，进入胆管造成广泛的组织损伤。胆管中的寄生虫活动导致导管上皮增生、炎症和纤维化。严重感染可引起胆汁淤积并导致肝萎缩和门静脉硬化[37]。慢性感染的常见症状包括胆绞痛和胆管炎。嗜酸性粒细胞增多在疾病的所有阶段都很常见。

4. 诊断 片形属吸虫的虫卵比其他复殖目吸虫的虫卵大(表 149-2)。片形吸虫卵不能与寄生于肠道内的布氏姜片吸虫卵相区分(图 149-4)，也与拟腹盘吸虫的虫卵相似(表 149-3)。个别片形属吸虫的虫卵在不同的宿主内，片形吸虫卵的形态和大小可能有很大的差异，使得有多种片形属吸虫的流行区内虫种的鉴别很复杂[74]。肝片形吸虫感染有较长的潜伏期(2 个月)，因此，片形吸虫病的血清学检查是有价值的。免疫学检查，尤其是基于虫体排泄/分泌抗原，半胱氨酸蛋白酶或鞘脂类的抗原的 ELISA 检测显示出高度的敏感性和特异性[75]。粪便中抗原的检测对于区分现症感染和既往感染是有用的[76]。值得注意的是，基于环介导等温扩增(LAMP)的分子诊断方法有希望成为对粪便中虫卵核酸检测的替代方法。

5. 治疗 片形吸虫似乎对吡喹酮不敏感，并且三氯苯达唑是备选药物(表 149-2)，有报道称在家畜中发现了对三氯苯达唑不敏感的分离株[77]。

(三)双腔吸虫科

双腔吸虫科属于进化枝斜睾目和双腔科在欧洲、亚洲、非洲和北美洲，普遍存在寄生于人的树突状双腔吸虫和牛双腔吸虫，它们主要感染反刍动物和兔子。生活史涉及陆地生螺和蚂蚁，它们是第二中间宿主。尽管很罕见，但人仍可能通过摄入蚂蚁被感染。假感染更为常见，并通过粪便中的特征性虫卵来鉴别。卵呈卵圆形，盖不明显，并且外壳密实。这种感染是在食入含有成虫的经典宿主的肝脏所致。表 149-2 提供了关于人双腔吸虫病的简要信息，但读者可以在《柳叶刀》参考其他评论[1,78]以了解更多信息。

五、肠道吸虫

人可以成为各种肠道吸虫的宿主。表 149-3 列出了一些肠道吸虫家族的信息摘要。短咽吸虫科、双穴吸虫科、裸茎吸虫科、枝腺吸虫科、微茎吸虫科、同盘吸虫科、斜睾吸虫科和枭型吸虫科很少感染人体，在这里不作详细介绍。读者可参考 Fried 等[79]发表的文章。棘口吸虫科、异形吸虫科、片形科和隐孔吸虫科的吸虫在某些国家较为常见，本章对其作如下讨论。

(一)棘口科

1. 病原描述 棘口科吸虫较小，典型的长 3～10 mm，宽 1～3 mm，有大的腹吸盘和明显的体棘。至少有 24 种该科的吸虫可以感染人，大多数分布在亚洲(表 149-3)[80]。

2. 流行病学、传播与预防 棘口吸虫病是人畜共患的寄生虫病，且集中分布，疫点往往在淡水或半咸水的生态环境。人体的感染是由于食入了生的或未煮熟的脊椎和无脊椎动物类的食物，包括螺类(表 149-3)。因此，棘口吸虫的感染与不同地理区域物种的生活史特征及人饮食习惯有关[80]。

3. 临床表现 在大多数情况下，感染是无症状的。重度感染可能导致多种症状，包括上腹部和腹部腹痛、疲劳、腹泻和体重减轻。一些儿童重度感染可致命。

4. 诊断 棘口科吸虫的虫卵与片形科吸虫的虫卵形状相似但要小一些(表 149-3)。在棘口科吸虫中，通过对虫卵大小的种间差异进行虫种的鉴定是不可能实现的，除非采用驱虫药驱出成虫。卵的皱纹或腹膜极增厚的证据可有助于鉴定[80]。最近，已经开发了一种以 28S 核糖体 DNA 为靶标

的单重实时荧光激活 PCR 试验，用于从异盘并殖吸虫和巨片形吸虫感染中区分马来棘口吸虫[81]。这三个虫种都有相似的虫卵，因此很难通过显微镜方法进行特异性的诊断。

5. 治疗 推荐吡喹酮单剂量 25 mg/kg 治疗[77]。

(二)片形吸虫

1. 病原描述 布氏姜片吸虫是该家族寄生于人肠道的唯一成员，是寄生于人体的最大吸虫，长 8～10 cm，宽 1～3 cm[82]。成虫寄居在人的十二指肠和空肠，其他宿主包括猪、马、牛、山羊和绵羊。这个虫种在许多国家呈集中分布(表 149-3)。

2. 流行病学、传播与预防 布氏姜片吸虫的螺类中间宿主见表 149-3。人感染是因摄入水生植物，在这些水生植物上，该吸虫的囊蚴成囊，或因饮用了含有囊蚴的水(囊蚴在水表面成囊)而感染[79]。

3. 临床表现 成虫吸附于小肠壁并摄取营养。人患该病与感染的严重程度相关，症状从肠道功能紊乱、疼痛、嗜酸性粒细胞增多到严重腹泻、胃痛、肠梗阻和恶心，据报道，有急性肾脏损伤和肠穿孔等并发症，严重的感染导致死亡[83]。

4. 诊断 粪便多且呈现黄绿色，含有未消化的食物残渣。布氏姜片吸虫的虫卵大、有卵盖、无内部胚胎、卵圆形和黄色(表 149-3，图 149-4)。虫卵与其他片形科吸虫的虫卵很相似，虫种的鉴定需要将成虫驱出观察。已经尝试开发用于使用核糖体序列来将布氏姜片吸虫与其他片形科吸虫分开的分子诊断工具。随着该虫种线粒体基因组的最新发表[84]，有可能成为一种有效的分子诊断工具。

5. 治疗 目前治疗使用的药物是吡喹酮，但阿苯达唑和甲苯达唑的使用也正在临床试验中[77,79]。

(三)异形吸虫科

1. 病原描述 与吸虫的进化枝后睾目密切相关，大部分异形科吸虫虫体较小，长度<0.5 mm。感染人体的异形科吸虫包括异形吸虫、横川后殖吸虫和单睾吸虫属。在很多国家已有关于人体感染异形吸虫的报道，包括亚洲、非洲北部和中东[79]。其他种异形吸虫在亚洲的农村也较为常见[85]。

2. 流行病学、传播与预防 虽然把许多具有医学感染意义的淡水螺作为第一中间宿主，但有些物种却感染了海洋螺。尾蚴在鱼体内成囊，包括鲻科、鲤科和虾虎鱼科。人由于摄入生的、新鲜腌渍或未煮熟的鱼类而感染(表 149-3)。成虫广泛寄生于捕食鱼类的鸟类和哺乳动物的肠道内。从宿主体内排出时，虫卵(图 149-3)已含胚蚴，但只有被螺类中间宿主食入后才孵化[1]。

3. 临床表现 人体的发病症状与感染强度有关，且感染对肠道黏膜产生刺激。虫卵有时会进入血液，并定居于组织中。在菲律宾已有关于虫卵引起致死性心肌炎的报道[37]。

4. 诊断 异形吸虫的感染是通过检测粪便中的虫卵进行诊断的(表 149-3)。异形科吸虫的虫卵与后睾科肝吸虫的虫卵大小相似，必须进行鉴别诊断。通常虫种的鉴定只能通过驱虫得到成虫来进行。对异形科吸虫感染的治疗建议使用单一剂量的吡喹酮(表 149-3)。

(四)隐孔科吸虫

1. 病原描述 隐孔科吸虫是吸虫进化枝斜睾目的成员。这个科的吸虫虫体小，呈椭圆形，寄生于哺乳动物，包括人。在北美和亚洲北太平洋沿岸分别发现了鲑隐孔吸虫包括鲑侏形吸虫和希口吸虫两个种，其囊蚴寄生在鲑鱼体内，这些被称为鲑鱼热吸虫，小而圆形，长 2～4 mm。

2. 流行病学、传播与预防 两种物种都能引起人感染。生活史以螺为主要宿主，以鱼类(通常为鲑鱼)为次要宿主。在北美，淡水螺充当中间宿主，吃或处理未煮熟的鱼会感染人，在以鲑鱼为饮食的大部分地区感染率高达 95%～98%，例如俄罗斯联邦东北部的土著居民中[86]。该物种可能是北美特有的最常见的人类吸虫。

3. 临床表现 感染鲑隐孔吸虫会导致腹部不适，恶心，呕吐，慢性腹泻，嗜酸性粒细胞增多，体重减轻和疲劳，进食生鲑鱼，未煮熟或熏制鲑鱼肉的生活习惯是北美感染的重要原因[87]。显然，鲑鱼卵也可能是感染源。在北美，鲑侏形吸虫是蠕虫新立克次体的载体，蠕虫新立克次体可导致鲑鱼中毒，并可引起犬发病，如果不及时治疗将会致命。该种立克次体尚未被证明可传染给人。

4. 诊断 通过检测粪便中的卵来进行诊断，该物种的卵为卵圆形，浅褐色，长度为 87～97 mm。成虫蠕虫几乎不产卵，在轻度感染中，粪便检查可

能不会发现卵。推荐使用粪便的三色染色来检查虫卵[88]。

5. 治疗 推荐使用吡喹酮(25 mg/kg)可有效治疗鲑侏形吸虫病。

(五)眼部吸虫

在欧洲、亚洲(包括菲律宾)、非洲、北美洲和南美洲的许多国家中,已记录到人偶然的眼部感染。属种(棘口吸虫目:嗜眼吸虫),可以在结膜中发育成成虫[89]。据推测,人是通过摄入水生植物而引起其囊蚴进入人体造成感染。在印度,前角囊吸虫属(后睾目:异虫科)引起眼部感染,而在埃及尼罗河三角洲,不明身份的吸虫感染是导致小儿葡萄膜炎的常见原因[10]。

参考文献请扫二维码查阅

第150章 不常见蠕虫

GARY W. PROCOP, RONALD C. NEAFIE

（季萍 译；张晓龙、陈家旭 审校）

本章包括不常见的蠕虫感染，尤其是那些由不常见的线虫和绦虫引起的感染。第149章对吸虫进行了深入探讨。本章列出了据报道可引起人类疾病的各种蠕虫，虽未全面介绍已报道可导致人类疾病的蠕虫，但包含了一些最受关注和最具挑战性的寄生虫病。需要了解疾病更多相关信息和其他蠕虫医学意义参见军事病理学研究所(AFIP)《传染病病理学》第1卷《蠕虫病》[1]和美国疾病预防控制中心(CDC)寄生虫学网站(http://www.cdc.gov/dpdx)。

一、样本的采集、运输和储存

无论蠕虫以何种形式存在，标本的采集、运输和保存方式相似，因此，在此统一陈述以减少重复。蠕虫存在于胃肠道内腔，如异尖线虫，可使用内镜取出。手术切除的样本可能包含成虫或幼虫。完整的蠕虫和手术标本可在60%乙醇或10%中性福尔马林中保存和运输，因福尔马林可使蠕虫组织变硬，故首选前者。寄生虫可在肠道内繁殖，因此粪便可作为重要的寄生虫诊断样本，例如，菲律宾毛细线虫，如有必要的话，应采用第136章所述的检测卵和寄生虫的标准方法进行样本采集和固定(如福尔马林和聚乙烯醇)。用于进行血清学分析的血液应以标准方法进行处理。本章中寄生虫诊断血清学试验的其他信息也可参见CDC（https://www.cdc.gov/dpdx/diagnosticprocedures/serum/tests.html.）

二、不常见的线虫

(一)异尖线虫及相关虫种

1. 分类 这一类群的生物，按现代生物种类分类，属于线形动物门线虫纲的第三进化枝，蛔虫目，异尖线虫科。

2. 病原描述 异尖线虫(*Anisakis simplex*)(简单异尖线虫为其典型种类)、伪新地蛔线虫(*Pseudoterranova decipiens*)和对盲囊线虫(*Contracaecum*)是胞管肾亚纲蛔总科，异尖科线虫。

3. 流行病学、传播和预防 异尖线虫幼虫存在于各种鱼类中，海洋哺乳动物是其终宿主；如果人食用了生的或未熟透的感染鱼则会发生感染[3]。盐腌或盐渍的鱼肉中仍含有存活的异尖线虫幼虫。类似情况，经烟熏的鱼或浸泡在酸橙汁中的鱼(如酸橘汁腌鱼)仍不能杀死这些寄生虫。一份报道称可能通过食用蛤类传播[4]。免于感染疾病的唯一方法是食用完全熟透的鱼肉。

4. 临床表现 根据疾病的发展阶段呈现出不同的临床特征。疾病是由蠕虫的物理存在和(或)人类对蠕虫抗原的免疫反应引起的。最常见的是，食用感染鱼后12 h内，患者会出现非特异性急性腹痛，同一时间范围内可能会发生过敏反应[5-6]。感染临床表现各种各样，从无症状到痢疾[7-8]。在此阶段，幼虫寄生于黏膜表层。浅表的幼虫可移行至食管，引起咳嗽，可能会伴随带有幼虫的咳痰，也可有腭扁桃体感染[9]。除此之外，幼虫在管腔内移动累及小肠和结肠时可引起中下腹部疼痛。异尖线虫偶然在一个无症状的人的结肠中被发现[7]。如幼虫穿透黏膜层至黏膜下层和更深层组织，则会引起更严重的症状(图150-1)，可引起白细胞增多和嗜酸性粒细胞增多症[10]。突然剧烈的腹痛可能被误认为是阑尾炎、急性胃炎、胃溃疡或慢性结肠炎(如克罗恩病)的表现[11]，也可能出现腹泻和便秘，以及大便隐血。免疫球蛋白E(IgE)介导的对异尖线虫的过敏性反应，包括急性荨麻疹和过敏反应[6,12]。

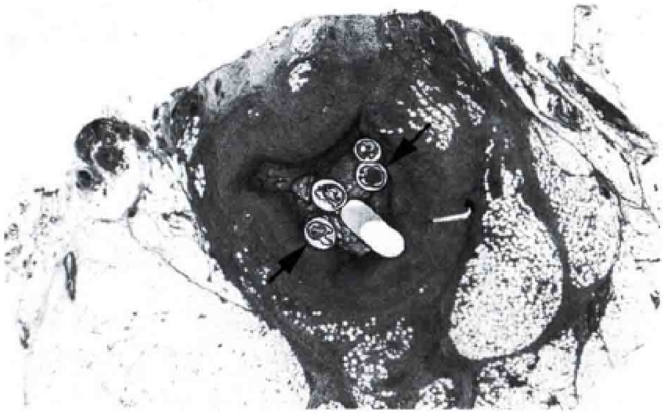


图 150-1　异尖线虫(箭所示)已穿透至腹部深层组织。网膜中可见多个幼虫横截面,直径是 300 μm。Movat 染色;原始放大倍数×2.5,见彩插

5. 显微镜检查　完整的虫体为白色至乳白色,幼虫不分节,大小(10～50)mm×(0.3～1.2)mm。一个背唇和两个侧腹唇及三角形的牙齿对于鉴定极为有用。端节或尾部突起是异尖幼虫其他实用的鉴定特征。感染组织病理学分析通常显示幼虫截面和宿主炎症反应,包括大量的嗜酸性粒细胞。横断面研究对于鉴定异尖线虫种类非常有用,但确切的属和种的划分对于治疗是不必要的。已经描述了基于分子和蛋白质的检测和表征方法,这些是食品工业中最常用的,通常对于诊断人体感染不是必要的[13]。

6. 血清学试验　在一家美国商业参比实验室中进行检测异尖线虫和相关虫种的免疫应答血清学试验。虽已开发多种血清学试验,但试验结果显示它们在敏感性和特异性方面存在差异。这些试验可鉴定出 85%～90% 的感染个体,表明在感染后 10～35 天出现血清学反应。这些检测的特异性有限,主要是因为与其他蛔虫有交叉反应,这可能会限制这些检测在某些人群(例如肠蛔虫个体)中的效用。

7. 治疗　当幼虫仅累及黏膜表层时,用内镜将幼虫取出是最有效的治疗方法。然而,手术切除可以清除更深部的幼虫。驱虫药治疗无效,但皮质类固醇可用于减轻相关炎症。最近,泼尼松龙和盐酸奥洛帕他定联合应用于肠道异尖线虫病的治疗取得了成功[14]。

(二)旋毛虫

1. 分类　旋毛虫是现代生物分类中的第一进化枝,这一类群的生物属于旋毛虫目(Trichocephalida)和旋毛虫科(Trichinellidae)的线虫纲(Dorylaimia)。本手册第 135 章对现代分类法作了全面的解释。

2. 病原描述　旋毛虫为本属线虫中致病最重要的种类,乡土旋毛虫(*Trichinella nativa*)、伪旋毛虫(*T. pseudospiralis*)、纳氏旋毛虫(*T. nelson*)、布氏旋毛虫(*T. britovi*)和其他的旋毛虫均可导致旋毛虫病[15]。

3. 流行病学、传播与预防　旋毛虫病呈全球分布[16]。旋毛形线虫的生活史不同于其他线虫,其寄生的哺乳动物首先作为该虫的终宿主,而感染性幼虫又可包裹于该终宿主的肌肉内(即中间宿主)(图 150-2)[15]。历史上家猪一直是这种蛔虫传播给人类的最重要宿主,其寄生循环主要是在农场仓院的家猪和啮齿动物之间传播。然而,在畜牧业良好的地区,猪的传播已显著减少。但熊肉、海象肉和其他野生动物同样可能带有感染期幼虫并且是人感染的主要原因。此外,许多其他不常见的食物来源,如狼、狐狸和浣熊,也含有旋毛虫。预防疾病的唯一途径是将潜在宿主的肉质产品彻底煮熟,并且可以尝试通过动物畜牧业良好管理控制这些宿主的旋毛虫病。

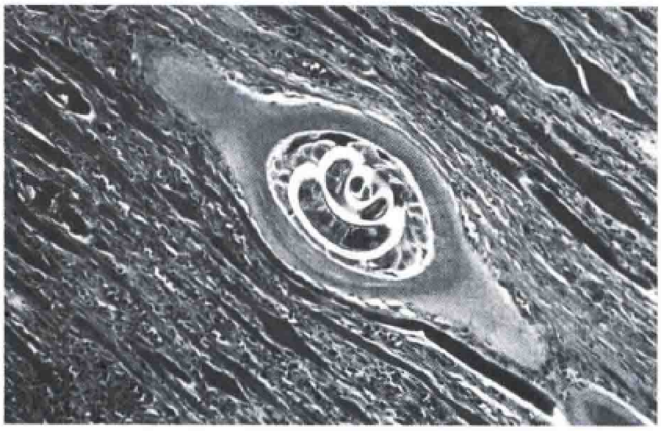


图 150-2　这一卷曲的第一期旋毛虫幼虫是一种"滋养细胞"。应注意滋养细胞外部的透明、非结晶外观及周围的慢性炎症浸润。虫体直径是 35 μm。苏木素-伊红染色;原始放大倍数×30,见彩插

4. 临床表现　根据感染寄生虫虫荷,感染可分为轻度、亚临床疾病至重度疾病。临床症状因感染阶段不同而存在差异。胃肠道症状与成虫有关,仅持续约 1 周,包括恶心、呕吐、腹痛和腹泻。发热、眼部周围尤为明显的面部水肿、肌痛和显著

的嗜酸性粒细胞增多是4种主要的旋毛虫病特征。5377例记录完整的病例调查显示，旋毛虫病主要临床表现显示为肌痛、腹泻、发热、面部水肿和头痛[16]。幼虫移行累及脑和脑膜，则出现神经系统症状，然而，若累及心肌则引起心肌炎，可致心律失常或心脏猝死。与在骨骼肌不同，幼虫不会在其他组织形成囊包。实验动物模型和来自受感染妇女的婴儿的配对血清学数据支持了妊娠期间垂直传播的可能性[17-18]。

5. 显微镜直接检查 肌肉活组织样本显微镜直接检查，将新鲜组织置于两载玻片间压薄暴露出幼虫，用显微镜观察。但是，伪旋毛虫不会产生包囊。更常见的是，石蜡包埋组织切片进行组织病理学（如外科病理学）分析检测旋毛虫幼虫（图150-2）。

6. 核酸检测技术 虽然核酸扩增分析已经用于进行旋毛虫检测，这些分析技术目前尚未进入临床应用阶段。酶免疫检测、快速循环PCR和最近的质谱检测等检测方法，均用于评估动物产品中是否存在该种寄生虫，以及家猪感染的状况[19-21]。

7. 血清学 80%～100%的患者在感染后3～5周出现抗体反应，紧随着急性期。因此，急性期患者的阴性血清试验转为（阳性）可以作为患该种疾病的证据。虽然其特异性低于100%，交叉反应往往导致试验值模棱两可，但血清学试验仍具有很高的敏感性。CDC和一些商业实验室进行这些试验。

8. 治疗 根据疾病的不同期采用不同的治疗方法。噻苯达唑或阿苯达唑对肠期虫体有杀伤作用，但对于囊包期幼虫无效，目前尚无杀灭囊包期幼虫的有效方法。然而，微晶体形式的治疗，在肠道阶段的作用，正被评估减少寄生的肌肉负担[22]。皮质类固醇、水杨酸盐类和抗组胺药或许能减轻由相关炎症引起的症状。

（三）弓蛔虫

1. 分类 这一类群的生物，是现代生物分类中的第三进化枝，属于线形动物门线虫纲，蛔虫目，弓蛔虫科。

2. 病原描述 犬弓蛔线虫是犬和其他犬科动物的肠内蛔虫，然而，犬弓蛔线虫也是猫的肠道蛔虫。虽然两种寄生虫的幼虫都能在人体中引起弓蛔虫病，但是绝大部分的感染是由犬弓蛔线虫引起的[23]。

3. 流行病学、传播和预防 弓蛔虫病呈全球分布，但这种人畜共患寄生虫病的流行状况各地不同。该病的人群血清流行病学反映了犬和猫等动物这种寄生虫病的控制情况。最高感染率出现于贫困地区且与犬类饲养有关[24]。荷兰对960只家犬和670只猫的粪便样本进行了大规模调查，结果证实，较年幼的动物更容易受到感染，就像那些被允许四处走动的动物一样。另外，发现动物主人们因知识不足不能为它们正确驱虫[25-26]。

弓蛔虫的自然循环始于终宿主粪便中非胚胎卵。受感染的动物每天排出大量虫卵，例如一只受感染的小狗每克粪便可排出超过10 000个卵[27]。因此，环境中的粪便污染（如在一个沙盒中）能够引起严重的污染。虫卵在土壤中孵育10～20天后发育成L2（二期）幼虫、这一阶段的虫卵具有感染性。如果虫卵被合适的终宿主摄取，然后幼虫穿透肠道并且在肝脏、血液和肺中移行。幼虫移行至呼吸道再被吞咽到胃肠道，发育成熟为成虫。转续宿主（例如兔）通过摄入虫卵保藏具感染性的幼虫也会参与到其生活史中。终宿主摄取转续宿主使得幼虫发育成熟，成为成虫。当非正常宿主，如儿童吞食犬弓蛔虫卵，弓蛔虫幼虫不能完成其生活史，而是在异常宿主体内移行，引起内脏幼虫移行症。通过对犬和猫驱虫控制人畜共患病达到预防目的。对于幼犬来说驱虫非常重要，这是由于幼犬最易受到感染，并且幼犬往往会和儿童在一起。其他预防措施包括远离动物粪便，彻底清洗水果和蔬菜及彻底煮熟潜在转续宿主的肉类[28]。

4. 临床表现 弓蛔虫感染是常见的人类蠕虫感染。幸好大部分感染临床症状不明显，仅产生轻度疾病致使难以寻求最终诊断。最严重的疾病累及眼部或主要累及心脏、脑或其他重要器官[29-30]。

5. 显微镜直接检查 弓蛔虫在人体不产虫卵，所以粪便检查对诊断没有帮助。然而，另一类土源性蠕虫虫卵，如蛔虫、钩虫或鞭虫，偶尔会作为常见的风险因素出现。通过组织病理学对外科手术切除组织中的移行幼虫进行检测，提供最终的形态学诊断结果，但幼虫并不常见于活检样本中。当幼虫出现时，单个微小侧翼和横断面直径对于这些寄生虫的组织学切片来说是非常有用的鉴定标准（图150-3）[31]。

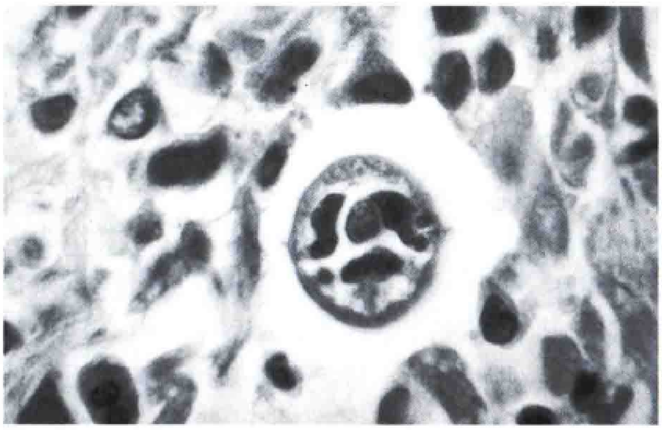


图 150-3 分侧鼻翼在弓蛔虫虫种鉴定中非常有用。虫体直径是 18 μm。苏木素-伊红染色；原始放大倍数×500，见彩插

6. 血清学试验 血清学研究对于弓蛔虫病的诊断方法建立非常重要，研究结果将与临床症状和其他实验室结果联合用于诊断，如 IgE 和嗜酸性粒细胞增多[32]。在没有其他确切检查结果的情况下，阳性表示既往感染或无症状感染。这些试验的敏感性和特异性较高，但是低于 100%。确定血清学试验的精确参考值存在一定难度，这是由于目前没有更好的寄生虫病原学检测方法（如金标准）证实真正的感染存在。这些试验已经成功用于血清流行病学研究。CDC 和商业参比实验室可进行相关试验。

7. 治疗 尚无已证实有效的治疗方法。通常采用据称长期治疗可增强疗效的阿苯达唑驱虫剂治疗或类似的治疗方法[33]。需要皮质类固醇控制大量寄生虫引起的患者炎症反应。眼部感染治疗需要医学和手术联合方式[34]。

(四)麦地那龙线虫

1. 分类 麦地那龙线虫(*Dracunculus medinensis*)是现代生物分类中的第三进化枝，属于线形动物门，线虫纲，龙线虫目(Camallanida)，龙线虫科(Dracunculidae)。

2. 病原描述 麦地那龙线虫又称为几内亚线虫，不是丝虫但却是龙线科家族成员之一，其他龙线虫在多种动物之间存在传染，但不会引起人类疾病。

3. 流行病学、传播和预防 麦地那龙线虫病仅可见于非洲农村地区。疾病更常见于干燥的季节中，对男性的影响比女性更大。最常见于 10～60 岁的人群，会影响社区当地的社会生产力。世界卫生组织、当地政府和大量其他人道主义组织持续的共同努力显著降低了每年的发病率[35]。1986 年开始驱虫工作时，当时有 350 万人感染了麦地那龙线虫[35]。2015 年，这一数字降至仅有 22 例，比 2014 年下降了 83%[35]。虽然已经取得了良好的进展，但彻底根除这种寄生虫的努力仍然困难重重，人们认识到了新的挑战[36-37]。WHO 和美国 CDC 最新资料和其他相关信息参见各自网址(http://www.who.int/topics/dracunculiasis/en/和 http://www.cdc.gov/parasites/guineaworm/)。

饮用含有感染性幼虫的剑水蚤(copepods)污染的淡水后可被感染。食入后，幼虫移行至腹膜后腔，自腹膜后腔发育成熟进行交配。雌虫最后移行至皮下部位，在此形成水泡，遇水后破裂并释放出大量幼虫。剑水蚤吞食幼虫，从而具有传染性。预防措施主要集中于宣教和提供清洁的饮用水[38-39]。

目前，正在乍得、埃塞俄比亚、马里和南苏丹四个国家出现传播[35]。政治动荡和战争阻碍了根除工作。此外，对犬类感染的识别，以及最近通过摄入来自异源性寄主的肉类（即鱼和青蛙）使根除工作变得相当复杂[36-37]。

4. 临床表现 在幼虫穿透胃肠道和腹膜后腔发育成熟进行交配的过程中，患者通常是无症状的。对于幼虫移行所引起的炎症和组织损伤而言，症状是次要的。虽然下肢的损害是最常见的，但损伤会出现在身体的任何部位。产生的匍行通道，是由虫体在皮下移行引起的（图 150-4）。形成大水泡将成为继发感染。死亡虫体可能被吸收、钙化或在局部再次产生症状（例如由于定位于关



图 150-4 患者阴囊皮肤麦地那龙雌虫造成的匍行孔道，见彩插

节致关节炎)。

5. 显微镜直接检查 破裂的水泡或溃疡处出现幼虫隆起可作为诊断。但是,在鉴别诊断中,有裂头蚴病的表现[40]。显微镜观察可见幼虫横断面30～50 μm 角质层、模糊的侧束、突出的背脊和平滑肌,充满了幼虫的大大的子宫填满了整个体腔(图 150-5);这些发现可以明确地将麦角龙线虫与裂头蚴病的病原区分开来。

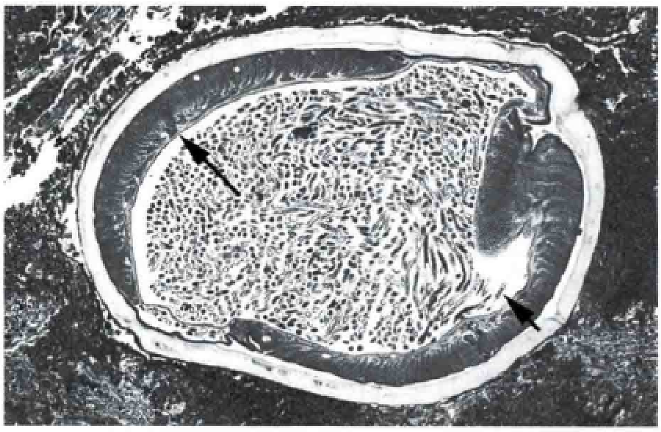


图 150-5 杆状幼虫(短箭所示)充满了妊娠的雌麦地那龙线虫体腔。还需注意躯体肌肉中出现的两个明显的带状(长箭所示)。蠕虫直径是 1.1 mm。Movat 染色;原始放大倍数×25,见彩插

6. 血清学试验 人群中已经有明显的疾病风险时,通常不需要进行血清学试验来诊断。然而,血清学试验对于进行血清学流行病研究非常有用,并可在成虫局部出现前用于鉴别感染个体。

7. 治疗 最古老和最传统的治疗方法见于古埃及医书《埃伯斯纸莎草书》(Papyrus Ebers),包括通过连续几天包裹虫体暴露端并采用轻微的压力移除含幼虫雌虫。使用噻苯达唑和甲硝唑进行治疗,虽然不能杀死虫体,但可将虫体轻松移除[38]。虽然此方法通常是有效的,但存在的风险包括在完全移除前导致虫体破裂或破损。目前,首选手术切除[39]。抗炎因子和抗组胺药对于缓解症状非常重要,抗生素类药物用于减轻继发的细菌感染,破伤风疫苗接种很重要。

(五)菲律宾毛细线虫

1. 分类 在现代生物物种分类中属于第一进化枝,该组中的生物属于线性动物门线虫纲,头孢目(Trichocephalida)和毛细线虫科。

2. 病原描述 菲律宾毛细线虫(*Capillaria philippinensis*)是一种鞭虫线虫,可引起肠内毛细线虫病[41-42]。其他毛细亚种(肝毛细线虫和嗜风毛细亚种)是人类疾病的较不常见的原因,不作进一步讨论。

3. 流行病学、传播与预防 菲律宾毛细线虫自然生活史可能涉及海洋鱼类,食鱼鸟类作为终宿主,鱼类为中间宿主。这种疾病是菲律宾、泰国和亚洲其他地区的地方病,最近有人担心这种疾病已蔓延到埃及[43]。目前还不知道菲律宾毛细线虫是如何传播到埃及的,但是已经假定了受感染的活鱼的进口或受感染候鸟体内寄生虫的传播[43]。当人摄入了生的或未煮熟且寄生有感染性幼虫的鱼时可被传染。在终宿主或患者肠道均可发现各个发育阶段的幼虫,并可能再次感染肠黏膜,从而引起过度感染。食用完全煮熟的鱼是防护措施之一。

4. 临床表现 菲律宾毛细线虫感染相对罕见,1994—2006 年泰国共计报道 82 例肠内毛细线虫病患者。同期还报道了来自泰国布里兰的 24 名感染患者[44]。因为可能出现肠内的高度感染,则感染会是致命性的[45-46],这种情况比较少见。在疾病进展的早期,主要是非特异性胃肠道症状,这些症状包括水泻、体重减轻、腹痛、水肿和虚弱[44]。随着疾病发展,虫体数量增加,会出现持续腹泻伴呼吸障碍,最终导致恶病质[46]。内镜检查可能对诊断是有用的,但粪便检查仍然是可选的诊断试验[47]。营养不良或细菌感染后会出现死亡(如败血症)。

5. 显微镜直接检查 粪便显微镜检查显示虫卵和幼虫的混合物。菲律宾毛细线虫虫卵两端各有一盖塞(图 150-6),外形易让人联想到最常见的鞭虫卵。然而,菲律宾毛细线虫卵呈矩形,盖塞不突出,卵壳表面有明显的凹陷[48]。成虫表面类似于粪类圆线虫(*Strongyloides stercoralis*),但因有单层柱状腺体细胞和三条杆状带而存在差异,后者在截面中更容易被识别。

6. 血清学试验 美国 CDC 或美国商业参比实验室均未进行血清学试验。一种用于筛选血清中针对菲律宾毛细线虫抗体的酶联免疫吸附试验已经建立,据报道该试验具有很高的敏感性和特异性[49]。本试验适用于粪便试验呈阴性的患者。与旋毛虫病、类圆线虫病、鞭虫病和其他蠕虫感染的患者可能有交叉反应,这可能会影响其特异性。

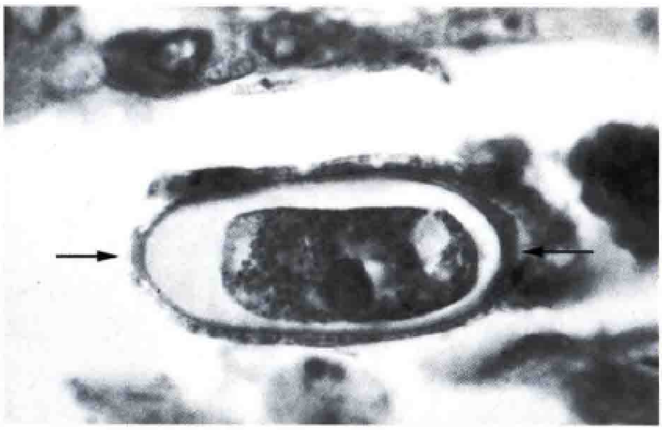


图 150-6　双极插头(箭所示)、卵壳凹陷和矩形形状均为毛细线虫的特征。该显微照片来自于人类小肠，显示卵长度是 40 μm。苏木素-伊红染色；原始放大倍数×490，见彩插

7. 治疗　阿苯达唑、甲苯达唑或噻苯达唑可用于治疗。疾病复发需要延长驱虫治疗时间。电解质补充和监测是非常重要的，据此来控制腹泻、加强营养。

(六)颚口线虫

1. 分类　按现代生物学物种分类属于第三进化枝，这一类群的生物分别属于线虫纲、旋尾目和颚口科。

2. 病原描述　颚口线虫是胃部旋尾线虫，终宿主是各种哺乳动物，不包括人类[50]。感染性阶段(三期)幼虫已知能够引起人类疾病，但也有人认为二期幼虫在不洁饮水中遇到剑水蚤也会引起疾病。颚口线虫感染导致皮肤和(或)内脏的幼虫迁移，后者包括眼部和中枢神经系统的表现。棘颚口线虫是人类疾病的最常见原因，但也有其他种类引起疾病的报道。

3. 流行病学、传播和预防　颚口线虫呈世界性分布。犬类和猫是颚口线虫的主要终宿主，然而，刚棘颚口线虫(*G. hispidum*)和杜氏颚口线虫(*G. doloresi*)可感染野猪和家猪，日本颚口线虫(*G. nipponicum*)是鼬鼠的一种寄生虫。

颚口线虫雄性和雌性成虫可生活在终宿主胃壁内的肿块中，成虫在此交配和产卵。虫卵进入粪便中，一旦入水，它们将会孵化和释放出第一期的幼虫。然后幼虫感染并发育成熟，在剑水蚤中成长为二期幼虫。当各种中间宿主，例如，鱼类、蛇、鳗鱼或青蛙吞噬剑水蚤后，幼虫将穿透新宿主的肠壁，在那里它们将成长为三期幼虫，移行至肌肉组织形成包囊。如果合适的终宿主摄食中间宿主，晚期的三期幼虫将会脱囊并穿透肠壁。然后三期幼虫移行通过肝脏、肌肉和结缔组织，仅有返回至胃部的幼虫才可发育成熟至成虫。另外，转续宿主，例如鸟类，可能会吃掉第二中间宿主；三期幼虫被摄入转续宿主，可能将它们传播至终宿主或人类。

寄生虫传播至人类是通过人食入生的或未煮透的第二中间宿主或转续宿主的肉类而发生的。人类是偶然宿主，幼虫在人体内不能发育成熟至成虫，并到处移行和侵扰[50]。通过把潜在的感染食物充分煮熟可以预防疾病的发生。

4. 临床表现　由于移行幼虫可能出现于任何组织或器官系统，因此颚口线虫病的临床表现千变万化[51-54]。虽然感染通常并不致命，但明显的临床症状与感染密切相关。临床表现取决于幼虫移行至何种组织。脂膜炎、爬行性出疹和假性疖病是颚口线虫病的皮肤表现[52]。任何内脏器官都可能受到影响，包括眼部和中枢神经系统(CNS)[53-54]。

5. 显微镜直接检查　颚口线虫成虫不会出现在人体中，但三期幼虫则会。三期幼虫与成虫在形态学上类似，但是相对较小，长度 3～4 mm，直径约 630 μm(棘颚口线虫 *G. spinigerum*)。头部球茎包含 4 行头部小勾，每行约 45 个。幼虫虫体与成虫相似，覆盖着成排的尖刺，虫体后端缩短。完整的蠕虫可从感染灶自然驱除或需要手术切除。

6. 血清学试验　在流行区主要采用血清学试验。美国未采用这些方法，需要时，美国 CDC 可以在必要时协调试验进行来源鉴定。这些试验应考虑包括其他寄生蠕虫的交叉反应的可能性。

7. 治疗　通过手术取出寄生虫是最有效的治疗手段，但由于虫体的移行，手术切除比较困难，可能需要一些先进的成像工具的辅助[55]。治疗常包括某些驱虫药物，如阿苯达唑或伊维菌素。关于 CNS 颚口线虫病的治疗目前仍然存有争议，有人认为驱蠕虫药治疗将会杀死侵入的虫体并加重炎症反应；支持性治疗应包括皮质类固醇用于控制炎症反应[56]。

(七)副圆线虫(管圆线虫)

1. 分类　在现代生物分类中，这一类群的生物是第五进化枝(色矛亚纲：Rhabditina)，属于线虫纲、小杆目(圆线虫目)和钩虫科。

2. 病原描述 广州管圆线虫和哥斯达黎加管圆线虫是引起管圆线虫病最重要的线虫[56]。

3. 流行病学、传播和预防 管圆线虫在世界广泛分布，但主要在东南亚、亚洲太平洋群岛、非洲和加勒比地区发生重要的公共卫生威胁。寄生于多种啮齿类动物，这些啮齿动物是终宿主。广州管圆线虫的成虫寄生于啮齿动物的肺动脉和右心室，而哥斯达黎加管圆线成虫寄生于回肠。成虫释放出的虫卵寄居于微血管，在此孵化出幼虫。随后幼虫上移至气管（广州管圆线虫），经吞咽随粪便排出。这些幼虫可感染软体动物，尤其是螺和蛞蝓，它们是中间宿主。在螺体内，它们发育成熟成为三期感染性幼虫。大量动物包括虾、蟹和蛙类可能食用感染的软体动物，可作为重要的转续宿主。啮齿动物的传染是通过吞食感染的软体动物或转续宿主的组织。在终宿主中，感染性幼虫穿透肠进入血液，并移行至中枢神经系统，在此它们进行两次蜕皮。之后，幼虫再次进入系统循环，最终寄居在右心室或肺动脉（广州管圆线虫）或回肠（哥斯达黎加管圆线虫）发育至成熟并完成循环。

人类的感染是通过摄入感染的软体动物或感染的转续宿主或摄入蛇或蛞蝓排泄物（如黏液）污染的其他食品（如蔬菜）。通过控制当地鼠类，彻底煮熟软体动物和转续宿主肉类，清洗可能遭受螺或蛞蝓污染的蔬菜，能够达到预防疾病的效果。

4. 临床表现 临床表现反映了虫体数量和虫体寄生部位，广州管圆线虫位于中枢神经系统，哥斯达黎加管圆线虫位于回盲区。广州管圆线虫仍处于幼虫阶段，在人类感染中与脑和脑膜相关（图150-7），并且通常在这些部位死亡。相反，哥斯达黎加管圆线虫通常会达到性成熟并在肠内释放虫卵。CNS 疾病患者显示出的体征和症状主要有脑膜炎或脑膜脑炎，伴有头痛、发热，可能的嗜酸性粒细胞增多症（10%～60%），有些出现神经系统紊乱，这取决于虫体所处的部位。脑脊液（CSF）显示脑髓液细胞增多、嗜酸性粒细胞增多（26%～75%），蛋白含量上升，有时包括未成熟的虫体。另外，患者眼部可能会出现感染，伴有视网膜剥离和失明。人感染导致肺部疾病并不多见。哥斯达黎加管圆线虫感染导致嗜酸性粒细胞肠炎，伴有腹泻和腹痛。

5. 显微镜直接检查 在组织病理学切片、临床样本如 CSF、眼部或其他感染组织中发现虫体可最终确认诊断。CSF 中嗜酸粒细胞增多或可作为 CNS 可能感染的第一指征。然而，CSF 嗜酸性细胞增多症的鉴别诊断比较广泛，包括其他寄生虫感染，如颚口线虫或弓蛔虫、过敏反应和球孢子菌病。雌虫有明显特征，子宫的螺旋缠绕和卵巢分支使其出现了“理发店招牌”的样子。雌虫的截面显示大的肠支和两个子宫，而雄虫的截面则显示了大的肠支和一条生殖管。广州管圆线虫不会在人体组织中产卵，然而，哥斯达黎加管圆线虫则会在人体中产卵。哥斯达黎加管圆线虫虫卵埋于人体组织中，未见于人粪便中。虫卵呈椭圆形、卵壳薄，类似于钩虫卵，大小(60～65)μm×(40～45)μm。

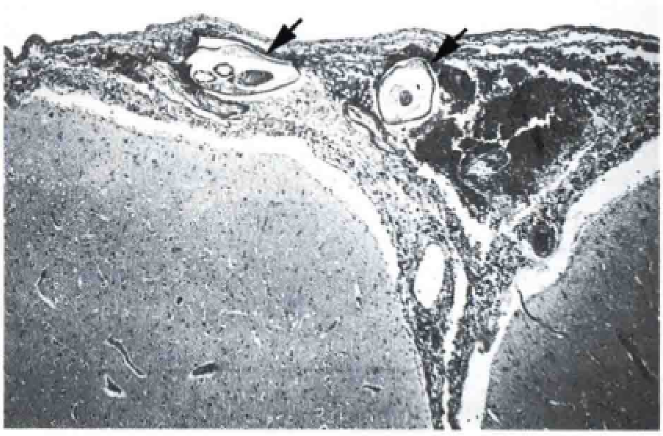


图 150-7 在患者脑膜中未成熟的广州管圆线虫（*P. cantonensis*）（箭所示）引起显著的嗜酸性粒细胞反应。虫体直径 200 μm。苏木素-伊红染色；原始放大倍数×50（AFIP negative 编号 73-6862），见彩插

6. 血清学试验 对于管圆线虫病而言，血清学试验是非常有效的诊断工具，尤其是因为广州管圆线虫通常定位于难以取样的部位，如 CNS。根据敏感性和特异性采用不同的血清学试验，试验者应充分了解准备采用的试验方法的特性和局限性[57]。尽管在感染过程中并不常出现鞘内抗体，但一旦检测到抗体，就为感染提供了有力的证据。美国的一些商业实验室也进行这项试验。

7. 治疗 尚无理想的治疗手段。幸运的是，该病常是自限性的。抽取脑脊液（降低颅内压），使用糖皮质激素和非甾体抗炎药以控制疼痛和炎症，可使用多种驱虫药作为治疗药物，甲苯咪唑是目前常用的药。对患者进行细心监护是非常重要的，因为驱虫药治疗有时会使症状恶化[58]，可单独使用皮质类固醇或联合驱虫药治疗[58]。

(八)犬恶丝虫和其他恶丝虫

1. 分类 在现代生物物种分类中,这一类群的生物是第三进化枝(色矛目:Spururina),属于线虫纲,旋尾目,盘尾科。

2. 病原描述 犬恶丝虫(*Dirofilaria immitis*),一种犬心脏丝虫,呈全世界性分布,引起人类肺恶丝虫病[59]。多种其他的恶丝虫可能会偶然感染人。例如,细弱恶丝虫(*Dirofilaria tenuis*)是一种浣熊寄生虫,常见于美国东南部;熊恶丝虫(*D. ursi*)在美国北部和加拿大流行,感染棕熊,匍行恶丝虫是一种犬类寄生虫,仅局限于东半球[60-61]。

3. 流行病学、传播和预防 虽然犬类是犬恶丝虫最主要的宿主,其他哺乳动物,如狐和熊也是合适的宿主。感染的犬类或其他合适的宿主血液中含有成虫产出的微丝蚴,成虫寄生于心脏的右心室。在蚊虫吸血过程中被摄入体内,在蚊虫体内发育成熟至感染性三期幼虫,并且可以通过吸血的方式转移至其他哺乳动物。幼虫通过皮下组织移行,最终进入血液,到达右心,在宿主体内发育至成虫。然而,人是非适宜宿主或非许可性宿主。犬恶丝虫在人体内发育成熟前死亡,并进入肺动脉循环中,随后寄宿于肺动脉亚段和小动脉,并可引起血栓、梗死和炎症,可最终在纤维组织壁周围形成肉芽肿性反应(图 150-8)。

犬恶丝虫病的地理分布反映了该病的流行状况。美国发病率最高的地区是南部,特别是沿海湾、大西洋海岸地区和沿密西西比河流域[61]。丝虫病广泛分布于南美、中美洲、澳大利亚、南太平洋岛屿、欧洲、俄罗斯和非洲部分地区[59]。有趣的是,犬的主人并不是疾病的风险因素之一。疾病的预防

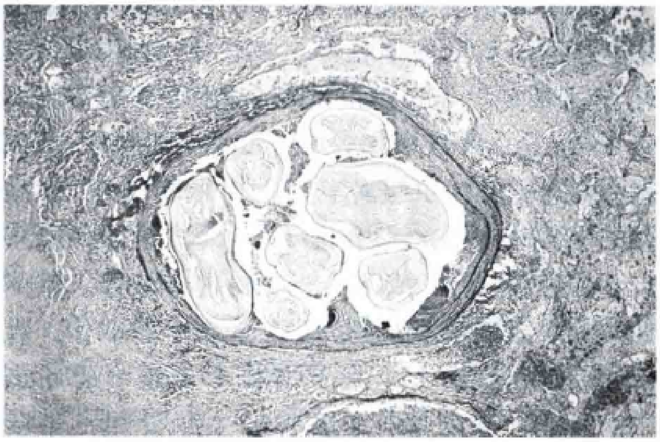


图 150-8 卷曲残留的未成熟的犬恶丝虫雄虫显示于肺动脉分支。最大直径是 250 μm。Movat 染色;原始放大倍数×15(AFIP negative 编号 71-11563),见彩插

以控制人畜共患疾病为中心。推荐使用驱蚊剂,特别是在高发病地区使用,可以阻断疾病传播。

4. 临床表现 半数以上的恶丝虫病患者是无症状的。其余患者出现非特异性症状,如咳嗽、胸痛、咳血、低热、恶寒和全身乏力[62]。仅 5%~10% 的感染者出现外周血嗜酸性粒细胞增多症。除肺部症状外,犬恶丝虫极少见于皮下脓肿、腹腔、眼部和睾丸。与犬恶丝虫相比,在局部皮下更容易发现其他恶丝虫(表 150-1)。Pampiglione 等进行了一项人类东半球肺恶丝虫病的关键性综述,表明基于传统的形态学研究结果,这些地区引起肺恶丝虫病的更有可能是匐行恶丝虫(*D. repens*)而不是犬恶丝虫[63]。在常规肺 X 线照片中通常会发现由犬恶丝虫引起的结节,在大部分例证中通过切除结节以排除恶性肿瘤[61]。这些结节通常是单个存在的,但有时也会出现 2 或 3 个结节。

表 150-1 其他不太常见的线虫

虫名	终宿主	中间宿主/媒介	疾病	诊断方法
动物源性钩虫(如锡兰钩口线虫、犬钩口线虫、巴西钩口线虫、钩藤属(狭头虫)	猫、犬和仓鼠	无	皮肤幼虫移行症(匍行疹)	临床症状或极少进行幼虫皮肤样本活检发现幼虫
美丽筒线虫	多种脊椎动物	多种甲壳虫	幼虫移行症	临床症状,切除物
恶魔蠕虫	无;自由生活	无;自由生活	脑膜脑炎	组织活检
恶丝虫属其他种类(犬恶丝虫)、细弱恶丝虫、匍行恶丝虫、厄氏恶丝虫、皮下丝虫和条纹恶丝虫)	(细恶丝虫)浣熊、(匍行恶丝虫)熊犬类和猫、(厄氏恶丝虫)熊、(皮下丝虫)豪猪、(条纹恶丝虫)野猫	蚊虫(除厄氏恶丝虫通过蜱传播外)	通常皮下结节包括成熟、未成熟或变性的蠕虫	切除组织中的形态学特征(图 150-10)

5. 显微镜直接检查 犬恶丝虫引起的肺结节较小(0.8～4.5 cm;平均 1.9 cm),胸膜下呈球形,界限清楚。犬恶丝虫具有光滑、厚实的角质层(5～25 μm),并且具有恶丝虫属的 3 层特征;其他感染人类的恶丝虫虫种具有类似的角质层,但是存在外纵脊(图 150-9 和图 150-10)。厚的多层角质层在侧索向内形成两个相对的内部纵脊。躯体肌肉通常比较明显,但是侧弦通常保存不佳。雌虫横向部分露出 2 个大子宫和 1 个较小的肠道(图 150-9),雄虫具有单管型的生殖管和一条肠管。根据内部结构对虫体的最终鉴定可能存在困难或无法完成,在许多样本中存在寄生虫的晚期分化。然而,在肺动脉出现虫体且同时有肺梗阻,通常已足以诊断。



图 150-9 2 个子宫(箭所示)、肌肉和 3 层(箭头处)、光滑表皮均为未成熟雌性 *D. immitis* 蠕虫的特征。蠕虫直径 250 μm。Movat 染色;原始放大倍数×80(AFIP negative 编号 72-2732),见彩插

6. 血清学试验 在几个参比实验室可以购买到检测恶丝虫抗体的血清学试剂。虽然之前进行了提高特异性而不影响敏感性的试验,但在其他线虫感染者中会出现交叉反应,尤其是其他丝虫。与许多血清学试验一样,阳性试验结果有助于诊断,然而,阴性的检测结果并不能排除感染的可能性。

7. 治疗 切除结节可以治愈。无须其他抗寄生虫药治疗。

(九)浣熊拜林蛔线虫

1. 分类 在现代生物物种分类中,浣熊拜林蛔线虫属线虫纲第三进化枝,属于蛔虫目,蛔虫科。

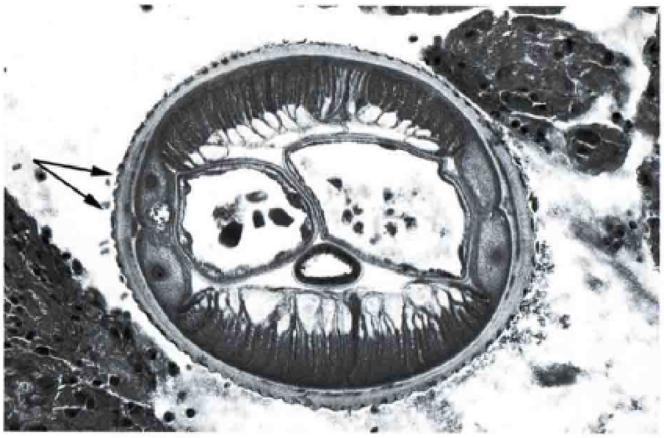


图 150-10 恶丝虫属除犬恶丝虫具有外部纵角质脊,然而犬恶丝虫表皮光滑。细弱恶丝虫横截面图像;直径 270 μm,具有明显的角质脊(箭所示)。恶丝虫属除犬恶丝虫外通常位于皮下部位而不是肺动脉管系统。Movat 染色;原始放大倍数×80(AFIPnegative 编号 94-5122),见彩插

2. 病原描述 拜林蛔线虫(*Baylisascaris procyonis*)是浣熊的蛔虫,是该属中最重要的人类病原。虽然存在其他种类的拜林蛔线虫,但它们很少与散发性疾病相关。拜林蛔线虫的成虫是大型的褐色蛔虫;较小的雄性体长 9～11 cm,而较大的雌性体长 20～22 cm[64]。

3. 流行病学、传播与预防 拜林蛔线虫和它的最终宿主北美浣熊一样分布广泛。尽管这种寄生虫最初只在北美流行,但携带这种寄生虫的浣熊已经作为动物园动物、毛皮生产动物或宠物出口到世界各地,这种方式不值得鼓励[64]。

幼浣熊通常是通过直接摄入卵而感染的,卵有时会附着在母浣熊的皮毛上。成熟的浣熊更容易通过食用受感染的动物而感染,如土拨鼠、兔子和啮齿动物,这些动物是受感染后产生幼虫迁移的中间宿主[65]。有趣的是,如果转续宿主没有死于幼虫的迁移,这种疾病使动物更容易受到浣熊的机会性捕食。雄虫和雌虫在摄入、迁移和成熟后,在浣熊的小肠内发育并交配。

据估计,每条雌成虫每天产卵 11.5 万～17.9 万枚[66]。一只受感染的浣熊每克粪便排出 2 万～2.6 万个卵(EGF),最高可达 25 万个卵[66]。除了高水平的产卵,由于浣熊宿主的行为,与其他浣熊物种相比,浣熊拜林蛔线虫感染的风险更高。众所周知,浣熊会大小便,这就是所谓的浣熊厕所[66]。这种大量粪便集中在一个地方的现象(即每一个厕所都含有大量的虫卵),使得浣熊厕所成为感染的高危地区。

传播是通过摄入被含虫卵的浣熊粪便污染的物质而发生的。拜林蛔线虫的卵对干燥有很强的抵抗力，即使在环境因素（如下雨）消除了浣熊厕所之后，它们仍能在环境中存活多年[65]。儿童，特别是男童由于某种原因，最常被感染[64-65]。浣熊的粪便中可能含有种子和其他引诱幼童的东西，异食癖是感染的常见危险因素[64-65]。

尽管控制当地的浣熊数量是一种预防措施，但这往往很难实现，因为这些动物生活和繁衍在人类的栖息地附近。应避免鼓励浣熊的行为，例如喂食和发现垃圾桶。认识到浣熊厕所的医学重要性并仔细清理它们，以及使儿童远离这些地区，是重要的预防措施。

4. 临床表现 浣熊拜林蛔线虫很容易感染人和其他各种动物，引起内脏、眼部和神经幼虫的迁移。尽管认为只有不到10%的感染幼虫到达了大脑，但那些确实是会产生严重疾病的幼虫，因为它们体型庞大，而且有攻击性的迁徙行为[67]。在15例报道的患者中，6例（40%）感染是致命的；7名（47%）幸存的患者被诊断为有严重的神经系统缺陷，5名患者失明[65]。

孩子进入浣熊厕所并可能吃了里面的东西，这是极为重要的暴露因素，但可能孩子记不住，甚至父母也不知道，这些都是比较重要的。外周嗜酸性粒细胞增多症、脑脊液嗜酸性粒细胞增多症和影像学上深部白质改变都是不明原因的脑膜脑脊髓炎患儿出现浣熊拜林蛔线虫病的线索[65,68-69]。在确诊前应及时行抗寄生虫和抗炎治疗（见下文），并送血清学检查确认。

除了上述的破坏性表现外，血清学研究还表明，可能由于摄入少量病原体而引起亚临床疾病的低水平感染可能比人们所认为的更为普遍[64,70]。

5. 显微镜直接检查 显微镜直接检查在浣熊拜林蛔线虫病的快速临床诊断中作用不大。偶尔，如果进行活组织检查，可能会看到迁移性幼虫。浣熊拜林蛔线虫的迁移性幼虫的直径为60～80 μm，有一个中央肠，每侧有一个三角形的侧排泄柱，位于身体中部横切面；幼虫两侧各有一个外侧角质层[66]。这些特征足以区别于幼虫迁移的其他原因。不幸的是，鉴于幼虫的迁移性，并非所有活检标本都含有幼虫。对于病因不明的致命性脑膜脑脊髓炎患者，尸检仍是确定死亡原因的重要手段。

6. 血清学试验 血清学试验是确诊浣熊拜林蛔线虫最重要的实验室手段。这些可通过疾病控制与预防中心及普渡大学兽医病理学系获得[64]。虽然这些浣熊拜林蛔线虫感染是罕见的，大规模的研究尚未进行，但血清学试验似乎足够敏感，以发现和确认患者感染。重要的是，这些检测也显示出高度的特异性，已经证明不会与弓形虫引起的幼虫迁移患者的标本发生交叉反应。

7. 治疗 浣熊拜林蛔线虫病患者的死亡率很高，而且在严重的临床感染后存活下来的患者中，长期发病率很高。意识到这种感染的可能性对于及时治疗至关重要。重要的是，有一些证据表明，在感染的早期阶段用阿苯达唑治疗可以减少或消除神经幼虫移行的可能性[66,71]。不幸的是，这种治疗机会经常被错过，而且这种感染的可能性在患者评估的早期没有被考虑。

在大多数情况下，直到确定了严重疾病并排除了脑脊髓炎的其他原因后，才考虑诊断。晚期推荐使用阿苯达唑，但即使治疗预后也较差；它常与皮质类固醇联用[65]。当主要出现眼部幼虫偏头痛时，可以由经验丰富的眼科医生对幼虫进行直接光凝固[65]。

三、其他不常见的线虫

除了在此描述的以外，还有一些不常见的线虫。这些虫种及其相关特征见表150-1。

四、不常见的绦虫

下面详细介绍的不太常见的绦虫是犬复孔绦虫，通常称为狗绦虫和迭宫绦虫，是裂头蚴病的病原体。表150-2描述了一些其他不太常见的可能感染人类的绦虫。

（一）犬复孔绦虫

1. 分类 按现代生物种类分类，这一类群的生物属于绦虫纲、圆叶目和复孔绦虫科。

2. 病原描述 犬复孔绦虫，犬和猫的常见绦虫，也常感染儿童[72-73]。

3. 流行病学、传播和预防 复孔绦虫呈全世界性分布。这种疾病类似于膜壳绦虫病，主要通过摄入具有感染性的跳蚤而传播。在自然循环中，犬和猫肠内成虫排出充满虫卵的妊娠节片。蚤

表 150-2 其他较不常见的绦虫[a]

生物体	终宿主	中间宿主	疾病	诊断方法
膜壳绦虫属 缩小膜壳绦虫	鼠类	昆虫	通常无症状；重度感染类似于重度短膜壳绦虫病感染	粪便中的虫卵(图 150-12)；粪便排出前节片破碎
膜壳绦虫属 微小膜壳绦虫[b]	大鼠；人-人传播可能	蚤	最小的绦虫成虫，可能感染人类，通常导致轻度疾病，患者通常无症状，严重感染可导致腹痛、过敏反应、厌食症、恶心、腹泻或便秘及肠胃胀气	对粪便中的虫卵进行特征鉴定；粪便排出前节片破碎并释放虫卵。虫卵为卵型，与缩小膜壳绦虫(*H. diminuta*)相比，其卵为球形，并且具有内部透明膜、卵壳较薄，极丝增多致使两极变厚，独特的钩球蚴包含 6 个小钩
不常见的绦虫属 巨颈绦虫 多头绦虫 锯齿状绦虫	 猫 犬科动物	 啮齿类 绵羊、家兔	幼虫期感染肝，类似于囊尾蚴病，多头蚴病，多头绦虫蚴在 CNS、眼部或皮下组织引起的感染(类似于囊尾蚴病)	 带囊尾蚴组织学切片 多头蚴组织学切片
中殖孔绦虫属	狐、犬、猫和其他哺乳动物	未知，可能爬行动物或节肢动物媒介	无症状或轻度腹部症状	对孕节和特征性子宫旁组织进行检测，粪便中通常无虫卵
伯特绦虫	灵长目	螨和其他可能的昆虫	无症状或轻度腹部症状	粪便中有能动的节片，类似于犬复孔绦虫感染，节片中虫卵没有储卵囊
无头虫属 马达加斯加绦虫		已提出摄取生甘蔗	无症状或类似于犬复孔绦虫感染症状	粪便中有能动的节片，类似于犬复孔绦虫感染，根据孕节和虫卵形态学特征及储卵囊中虫卵数鉴定
瑞列绦虫属	鸟类	昆虫、蚯蚓、螺类	无症状或类似于犬复孔绦虫感染症状	粪便中有能动的节片，类似于犬复孔绦虫感染，根据孕节和虫卵形态学特征及储卵囊中虫卵数鉴定

注：[a] 吡喹酮是成人绦虫感染的首选治疗方法，它也对治疗神经衰弱有效。有效的预防措施集中在控制人畜共患病宿主(如猫或狗)中的疾病或控制人畜共患病宿主本身(如鼠类)。控制中间宿主也是有效的，但实际证明可能会更困难。[b] 此寄生虫在本书第 148 章中进行详细介绍

或虱作为中间宿主吞食虫卵。在中间宿主体内虫卵孵化，释出的幼虫穿透体腔，在体腔中发育成熟成为具有感染性的似囊尾蚴。一旦吞食感染的中间宿主，该似囊尾蚴续绦期幼虫附着于小肠并发育成熟至绦虫成虫，完成生活史。该虫的发育成熟通常是在更常见的动物宿主，例如犬类和猫中，但也可见于人体中。通过动物驱虫和加强蚤和虱的控制能够达到预防效果。

4. 临床表现 复孔绦虫病通常是良性感染。较大虫量可能会引起体重减轻、腹痛、生长不良或出现绞痛，但这些严重病症并不常见。当粪便中出现活动的孕节时，通常能够引起患者父母和儿科医生的注意，常被误认为是蛲虫感染，这强调了实验室寄生虫鉴定的重要性。

5. 显微镜直接检查 肉眼检查犬复孔绦虫节片聚集成米粒状。与大部分其他绦虫相比，它们的不同在于具有 2 个生殖孔，可将节片压在两张载玻片用解剖显微镜进行观察。也可以通过虫卵特征(卵壳)(图 150-11)和(或)虫卵特征(虫卵特

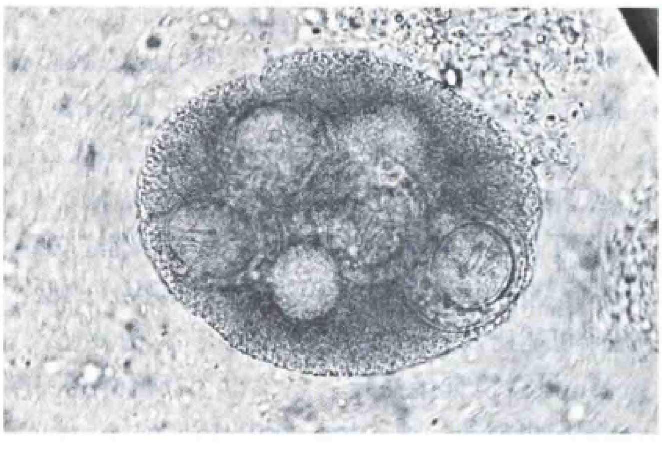


图 150-11 来自破碎孕节的犬复殖孔虫卵的 1 个储囊，直径 150 μm。包内虫卵直径是 40 μm。未染色(AFIPnegative 编号 86-7369)，见彩插

点是具有明显的形态学特征，如 4 层皮)进行鉴定。对于虫卵或卵壳，粪便检查可能是无效的，这是因为完整的节片通常进入了粪便。节片显微切割或组织学检查表明存在虫卵和卵壳。除卵壳外，节片检查可见其他绦虫常见的特征，例如，外

皮、平滑肌和钙质小体。

6. 血清学检查 由于疾病通常为亚临床状态且不易引起怀疑，一般不进行血清学试验，当发现节片并检查后即可诊断。

7. 治疗 吡喹酮和氯硝柳胺可有效治疗犬复孔绦虫。应对家养宠物进行及早发现、早检查和早治疗，同时应控制侵袭性蚤类。

(二)迭宫绦虫属

1. 分类 此组寄生虫按现代生物种类分类，属于绦虫亚纲、假叶目和裂头科。

2. 病原描述 裂头蚴病是假叶目绦虫的三期幼虫——裂头蚴引起的人类感染疾病[74]。裂头蚴在人宿主体内不能发育成熟，已知属于裂头蚴属。引起裂头蚴病的绦虫有曼氏迭宫绦虫(*Spirometra mansoni*)、拟曼氏迭宫绦虫(*S. mansonoides*)、林蛙迭宫绦虫(*S. ranarum*)和猬迭宫绦虫(*S. erinacei*)。增殖裂头蚴绦虫(*S. proliferum*)的准确分类学关系尚不明确，但该虫种可能是拟曼氏迭宫绦虫或猬迭宫绦虫的变种。有关这种生物的其他信息可以在第 148 章中找到。

3. 流行病学、传播与预防 迭宫绦虫是广泛分布于动物(尤其是犬和猫)体内的绦虫。这种寄生虫的生活史从适宜的感染宿主排出的虫卵开始，虫卵孵出的钩毛蚴感染第一中间宿主剑水蚤，第二中间宿主包括蛇、蛙和鱼类，通过吞食感染的剑水蚤而被感染，当终宿主摄食第二中间宿主标志着生活史完成。人为非适宜宿主，并且通过摄入生的感染性剑水蚤污染的水而感染。人也可因为使用感染动物的肉(如蛙肉)作为敷药而感染。

4. 临床表现 吞食裂头蚴后的后果取决于宿主的种类和幼虫的种类。例如，人吞食了阔节裂头绦虫(*Diphyllobothrium latum*)裂头蚴，发育至成虫，然而，吞食了迭宫绦虫裂头蚴，在新宿主体内仍继续以幼虫形式存在(如裂头蚴)[75]。这一情形，在生物学上人就是第二中间宿主或转续宿主。其临床表现受寄生虫数量(大部分患者仅感染一种绦虫)、所在部位和虫体活力的影响。裂头蚴可以移行，但这种移行通常不会引起相关症状，但是移行至皮下部位则会引起结节[40]。切除结节可以排除发生恶性肿瘤的可能。眼裂头蚴病，尤其是结膜，可能是贴敷含有生蛇或生蛙组织的民间验方敷剂引起。裂头蚴死亡可造成炎症反应，有时会出现钙化，如发生于脑部，则会引起梗阻性脑积水[54]。在龙线虫流行地区，穿过溃破的皮肤疡暴露出的皮下裂头蚴被误认为是龙线虫[40]。

5. 显微镜直接检查 迭宫绦虫的裂头蚴扁平、带状，与绦虫成虫相似(图 150-13)。进一步检查可见未发育成熟的无钩头部、有裂隙即吸槽(图 150-13)[76]。无成熟节片。裂头蚴组织病理学检查显示可见绦虫特有的钙化小体，未见发育成熟的内脏器官，但是在疏松的间质中可见不规则分散的平滑肌纤维和排泄管。

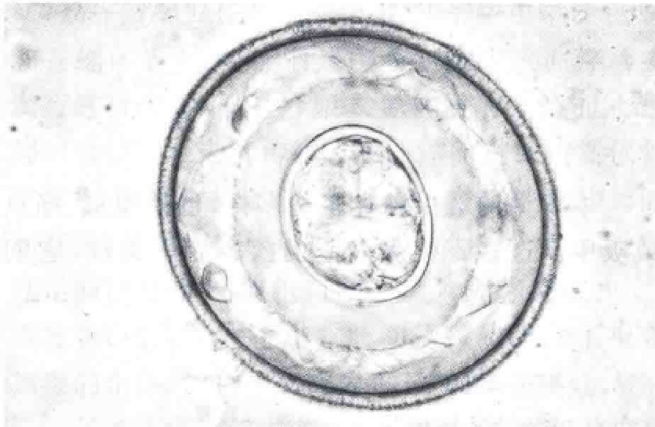


图 150-12 缩小膜壳绦虫虫卵厚内膜由凝胶状基质包围，外部是条纹状的外壳。长膜壳绦虫虫卵球形，而微小膜壳绦虫虫卵为卵圆形。此处虫卵直径 80 μm。未染色；原始放大倍数 × 250 (AFIPnegative 编号 96-5119)。参见第 148 章“绦虫”，进而获得关于膜壳绦虫属更详细的信息，见彩插

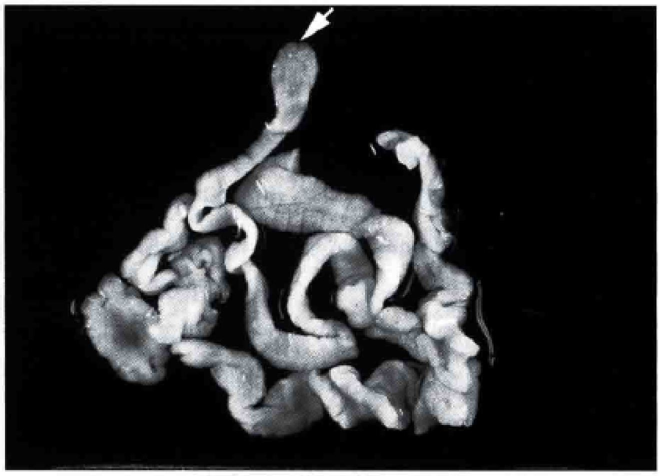


图 150-13 裂头蚴表面上类似于绦虫成虫。但详细检查可清楚看到其未成熟形式，头上仅有 1 个腹沟或吸槽(箭所示)且没有节片。最大宽度 6 mm。未染色；原始放大倍数×0.5(AFIPnegative 编号 70-15303)，见彩插

6. 血清学试验 通常在手术中发现活的裂头蚴,诊断是没有问题。大部分诊断来自肉眼观察,但组织病理学检查则用于确诊。在此情形下,血清学检查是没有用的。然而,如果是临床疑似病例,则可以通过联合放射学和血清学检查进行诊断[77]。针对迭宫绦虫的血清学试验无商业化试剂,因此可将样本送至专门的中心去检测。

7. 治疗 药物治疗目前被认为不适合治疗裂头蚴病,因为裂头蚴对吡喹酮具有抗性。建议进行外科手术完全切除。不全切除,尤其是虫体头部仍然存在组织中,可能会导致虫体继续生长[1]。

五、总结

不常见的蠕虫种类多种多样,包括线虫、绦虫或吸虫。这些寄生虫引起的疾病令人关注,它们的生活史及与宿主的关系复杂。所引起的疾病从临床症状不明显,如复孔绦虫病,到可能危及生命,如拜林蛔虫病;多数情况下,这类寄生虫病仅发生于某些特定地域,这主要取决于该地区终宿主和中间宿主的种类。饮食习惯和民间医药习俗对人类疾病的流行也有重要作用,这也与摄食或使用未加工的动物制品有关。这些寄生虫病的治疗方法各不相同,主要取决于感染的病原种类,但是常用的预防措施可以显著降低这些寄生虫病的传播。这些措施包括动物宿主和传播媒介的控制、水果和蔬菜的清洗、饮用清洁的饮用水及食用前将肉类彻底煮熟等。

参考文献请扫二维码查阅

第151章　重要医学节肢动物

SAM R. TELFORD Ⅲ，BLAINE A. MATHISON

（季萍　译；张晓龙、陈家旭　审校）

节肢动物由多种无脊椎动物组成，共同特征是身体分节，有几丁质的外骨骼。重要医学节肢动物主要包含4大类：昆虫纲、蛛形纲、甲壳纲和多足纲（马陆和蜈蚣）。所有节肢动物类已经存在了数亿年，从而为其生活史进化提供了充足的机会，从寄生到独立生活的进化及在各大类间的多次进化。

医学重要节肢动物长期以来被认为由体外即在皮肤上活动的寄生虫组成。然而，寄生仅是人体与医学重要节肢动物之间相互作用的一种。节肢动物可通过叮咬、叮刺、穿孔或分泌有毒化学物质等主动方式抵御被捕食（碾碎或拍打）。这些防御手段，对捕食者无论是人或其他节肢动物都很有效。被动的防御手段可能无意伤害到人类，如某些毛虫的纤毛会刺激产生荨麻疹反应。节肢动物在医学上很重要，可能是由于间接影响：昆虫恐惧症、寄生虫妄想症，或者尘螨导致的过敏反应。节肢动物对人类健康带来的多种影响反映出这些动物的多样性，但只有极少数例子，仅就节肢动物产生疼痛来说，可能是由于自然选择产生的偏向。因此，应视节肢动物为自然环境的一部分，虽然在个别情况下可能导致病理反应。另外，由于节肢动物数量众多，因此其导致的危害不可避免。

一、媒介节肢动物

临床上节肢动物被认为是一类传播媒介，可以传播病毒、细菌、原虫和蠕虫等。传染性病原体与特定的节肢动物存在专性寄生（生物性传播），或单纯的污染节肢动物（机械性传播）进行传播。疟原虫在特定蚊虫体内经历一个复杂的发育周期，缺乏该类蚊虫就无法存活。相反，沙眼衣原体（*Chlamydia trachomatis*）被发现存在于眼潜蝇和苍蝇体表[1]，可能通过媒介在宿主表面停落或爬行进行传播，但是沙眼衣原体更容易通过宿主间的直接接触进行传播。病原体的机械传播依赖于其稳定性和感染量。如HIV，在体外无法长时间存活，这类病原体可进入蚊虫的口器，然而缺乏充足的活性淋巴细胞，HIV就无法感染蚊虫[2]。因此，蚊虫或其他嗜血节肢动物虽然吸食了携带病毒的个体，但仍无法成为HIV的传播媒介。

目前主要有5类媒介：双翅目（苍蝇和蚊虫）、半翅目（猎蝽）、蚤目（蚤）、虱目（虱），以及蜱螨类（蜱和螨）。每个类群的生活史是我们了解媒介效能的基础，即生理学和生态学特征共同促进病原体的传播。媒介与病原体之间的简要关系见表151-1，详细关系在本书其他章节论述。

（一）双翅目

双翅目媒介属于有翅类昆虫，包括蚊虫、白蛉、蚋、蠓、虻和采采蝇等。这些吸血昆虫的体型由小（如蠓、蚋长度小于2 mm）到大（虻长度可大于2 cm）。与其他有翅类不同，双翅目昆虫仅有一对翅膀。双翅目昆虫中吸食血液的雌性成虫可作为媒介。血餐的作用是为产卵（非自育性生殖）提供营养；产卵后将继续吸血，从而产更多的卵。因此，除非某只蚊虫（以双翅目为例）继承亲代的感染性（经卵或垂直传播），否则只能通过首次血餐感染蚊体后，第二次血餐时才具有传染性。在适宜的环境下，蚊虫可存活数周并可进食两次以上的血餐。苍蝇和蚊虫的雌雄两性都需要糖餐（一般来源于植物花蜜），但只有少数种类可以仅靠糖分产卵（自育）。

双翅目一般将卵产于水或腐质中。蛆型幼虫孵化后将在水或腐质中经历几个阶段（虫龄），以

表 151-1 节肢动物主要媒介属简表

节肢动物	病原体	疾病
甲壳纲		
十足类	并殖吸虫属	肺吸虫病
桡足类	裂头属	裂头蚴病
	麦地那龙线虫	麦地那龙线虫病
	棘颚口线虫	颚口线虫病
昆虫纲		
吸虱目		
虱属	普氏立克次体	流行性斑疹伤寒
	五日热巴尔通体	战壕热
	回归热包柔螺旋体	流行性回归热
蚤目		
客蚤属、鼠蚤属	鼠疫耶尔森菌	鼠疫
	斑疹伤寒立克次体	鼠型斑疹伤寒
	缩小包膜绦虫	鼠型斑疹伤寒
蚤属、山蚤属	鼠疫耶尔森菌	鼠疫
栉头蚤属	犬绦虫	犬绦虫病
半翅目		
锥蝽属、红猎蝽属、锥猎蝽属	克鲁锥虫	美洲锥虫病
双翅目		
伊蚊属	吴策线虫、马来丝虫	丝虫病
	黄病毒	登革热，黄热病
	其他虫媒病毒	虫媒病毒脑炎
按蚊属	疟原虫	疟疾
	吴策线虫、马来丝虫	丝虫病
	其他虫媒病毒	虫媒病毒脑炎
库蚊属	吴策线虫	丝虫病
	其他虫媒病毒	虫媒病毒脑炎
库蠓属	曼森线虫	丝虫病
采采蝇属	布鲁斯锥虫	非洲昏睡病
斑虻属	罗阿丝虫	罗阿丝虫病
	土拉热弗朗西丝菌	土拉菌病
蚋属	旋盘尾丝虫	盘尾丝虫病
	奥氏曼森线虫	丝虫病
白蛉属，罗蛉属	利什曼原虫属	利什曼病
	杆菌状巴尔通体	巴尔通体病
	白蛉病毒	白蛉热
蛛形纲		
蜱螨亚纲(蜱)		
硬蜱属	伯氏疏螺旋体	莱姆病
	嗜吞噬细胞无形体	人粒细胞无形体病
	康氏立克次体	南欧斑疹热
	巴贝虫属	巴贝虫病
革蜱属	立氏立克次体	落基山斑疹热
	土拉热弗朗西丝菌	土拉菌病

（续 表）

节肢动物	病原体	疾病
	科蜱病毒属	科罗拉多蜱热
	黄病毒属	鄂木斯克出血热
钝眼蜱属	立氏立克次体	落基山斑疹热
	土拉热弗朗西丝菌	土拉菌病
	沙费埃里希体	人单核细胞性埃立克体病
璃眼蜱属	内罗毕病毒属	刚果出血热
扇头蜱属	康氏立克次体	南欧斑疹热
	立氏立克次体	落基山斑疹热
钝缘蜱属	疏螺旋体属	回归热
蜱螨亚纲（螨）		
纤维纤恙螨属	恙虫热立克次体	恙虫热斑疹伤寒
刺脂螨属	螨立克次体	立克次体痘

有机物或细菌为食，最终发育成蛹并羽化为成虫，这一过程称为完全变态（完全变态发育）。不同的双翅目种类在不同的温度下，其生命周期可能只有 1 周。采采蝇是一个例外，采采蝇每次吸血后仅产生 1 只晚期幼虫，在为期几周的孕育中，幼虫从乳腺类似物中获得营养[3]。这一生殖方式使得杀灭成虫（诱捕和喷雾）对于降低采采蝇种群数量从而减少睡眠病病原体的传播非常有效。

双翅目吸血昆虫同血源的接触短暂。感知宿主因素包括体温、二氧化碳（宿主呼吸）、机械振动、乳酸和其他皮肤分泌的化合物。苍蝇通过 1 对复眼搜寻宿主，倾向于选择深色且运动中的宿主，但似乎需要宿主体表气味刺激。目前大量使用的驱避剂二乙甲苯酚胺（DEET）通过干扰位于昆虫触角上的气味关联离子通道发挥作用[4]。一旦确定了宿主，取食行为随即发生并且在数分钟内结束。白蛉、蠓和蚊具有多种唾液活性组分促进发现并采集血液。在刺穿皮肤时，抗凝血和抗炎症的化学物质随即进入皮下取食隧道。穿刺过程会划破毛细血管，ADP 从破损的内皮细胞内释放，加速血小板活化，然而媒介所分泌的三磷酸腺苷双磷酸酶会切割 ADP 成为环腺苷一磷酸，因此在这些媒介吸血期间，血小板的凝结将显著降低。同时，吸血昆虫分泌的前列腺素 E_2 会暂时抑制局部炎症反应[5]。因此，虽然蠓在叮咬后会在宿主皮肤上留下一个触之有热感的肿块，但最初的几次叮咬却无法被宿主察觉。这些肿块可能会持续几天并伴随着低热。这种“黑蚊热”不必当作感染对待，因为它无需治疗，可自愈。

在媒介取食期间被注入皮下的各种蛋白质是过敏反应的根源，当宿主 1 周内暴露超过 1 次时，会以发痒作为主要症状，而在数月内反复暴露时，宿主将产生耐受性，并最终对叮咬失去反应。虽然仍需进一步研究，但目前认为不同媒介间唾液中物质可能会存在某些交叉反应，以致一些个体对蚊、臭虫或蜱叮咬后的反应相同。

吸血蝇类分泌唾液的器官比较粗糙，同时也反映出其取食方式比较原始。它们往往是用粗糙的上颚刮伤皮肤，取食创口中的血液和淋巴液。这也说明，苍蝇的叮咬痛感很强，在人身上吸饱血的成功率很低。

吸食新鲜血液的双翅目昆虫饱血后会在附近的垂直表面上寻找利于消化和排尿的栖息地。这一习性使得室内吸血的物种易采用室内杀虫剂滞留喷洒进行防控。

吸血双翅目昆虫经血餐带来的这种短暂自然感染意味着几乎无样本被送到临床实验室。除了对虫媒相关感染进行诊断研究之外，双翅目昆虫导致的过敏和蝇蛆病也应受到实验人员的注意（见下文）。

（二）半翅目

半翅目中唯一作为媒介的是接吻虫，即猎蝽。该类群丰富多样，具有复眼、触角、刺吸式口器、2 对翅（1 对精巧的翅隐藏在另 1 对强壮的翅下），以及腹部分节。所有虫体无需放大镜可直接观察，成虫体长约 1 cm，锥猎蝽亚科的成虫体长 1～5 cm。雌虫产少量的卵，卵中直接孵化出成虫模

样的若虫。蛹经历一次不完全变态(半变态),通过5个若虫期,每个时期需要一次血餐。其整个生命周期持续3个月~2年。猎蝽常常隐藏于泥墙缝隙或其他一些狭窄的缝隙里。在新北区,它们被认为是锥虫病的媒介(克氏锥虫、恰加斯病的病原体;让氏锥虫和非致病性锥虫,常常与克氏锥虫共同传播)。在东南亚,红带锥蝽(*Triatoma rubrofasciata*)传播一种可感染猴子的锥虫。但是目前为止,在古北区尚未发现感染人的案例。有趣的是,在美国加利福尼亚中南部地区,以及北部到马里兰,存在南美锥虫病传播循环链,但罕见本土人感染南美锥虫病的案例。这一悖论存在有两个原因:在屋内使得人们很少接触到该类昆虫,更重要的是,美国南部的主要媒介,吸血锥蝽(*Triatoma sanguisuga*),当它在宿主身上进食的时候并不会同时排便[6]。克氏锥虫传播给人需要在叮咬处有含有锥虫的锥蝽粪便污染,但最近巴西报道显示,饮用猎蝽排泄物污染的蔗糖水也会感染[7]。

同蚊一样,猎蝽分泌的唾液含有一些活性物质。与蚊不一样的是,在家中被猎蝽反复叮咬会引起非常危险的过敏反应。研究猎蝽的科学家们常常需要携带肾上腺素注射器,以防猎蝽的反复叮咬输入大量唾液抗原组分引起疾病。

虽然在拉丁美洲以外的临床实验点可鉴别叮咬患者的猎蝽(图151-1),但容易误认为是同半翅目有关的如捕食昆虫刺蝽象,或者靠吸食植物汁液的九香虫、麦虱、莱蝽或南瓜虫等。刺蝽象通过它们刺吸式的口器会造成极端痛苦的伤口,这些伤口仅需要典型的急救措施,或对较深的伤口注射破伤风毒素(喙长3~8 mm)。猎蝽吞食植物会分泌有害物质,这种分泌物假使被偶然吞食(被锥蝽污染的可直接食用的水果或蔬菜),味道会很臭,否则不会引起注意。

臭虫(温带臭虫和热带臭虫)属于半翅目,但尚未发现是任何病原体的媒介。这种昆虫短而宽阔的头部,椭圆形身体,以及4节触角,不完全变态,5个若虫期,每个若虫期需要吸食血液。生活史大概为6~8周,最长可达11个月,这取决于温度和湿度。在无食物情况下可生存数月。它们体型小,成虫≤5 mm(图151-2)。它们平时通常隐藏起来,隐藏地常为墙壁缝隙,褥子底部,或一些藤制家具中。该虫晚上活动,侵扰熟睡的人,通常

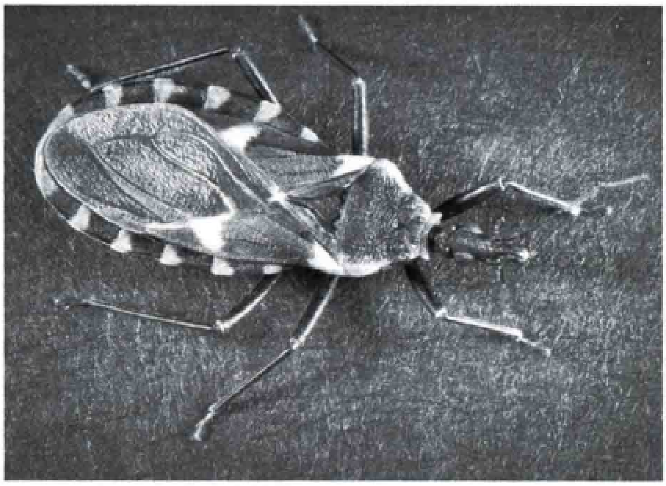


图151-1 猎蝽(吸血锥蝽)。所有的猎蝽有一个相似的特点:身体的背腹都是扁平的(边缘经常出现褶皱),折叠翅膀,和"锥形"鼻子(图片由CDC-DPDx提供),见彩插

吸血时间为10~20 min。吸血过程会被人体活动而打断,从而造成多次叮咬(图151-2)。根据生活史阶段的不同,血餐频率通常为每周1次,一次产卵10~50个,每个雌虫一生可产200~500个卵。臭虫的反复叮咬会导致严重的过敏反应。多个实验室发现在人工实验室条件下,臭虫可感染HIV、乙肝病毒、土拉弗朗西斯菌和西尼罗病毒。但从流行病学来说,臭虫与上述病毒感染毫不相干。尽管并非不可能,但臭虫作为病毒媒介的可能性极小,与之相比,医生更愿意关注于患者的毒品使用情况。臭虫泛滥已成为城市居民的主要抱怨(https://www.epa.gov/bedbugs),尤其是在多种族的家庭社区中。臭虫很容易通过行李或丢弃和改变用途的家具(尤其是床垫)传播。

由于很多种群抗药性的发生,臭虫的防控越来越困难。很大比例(大于70%)的臭虫侵扰都和床上用品有关,如床垫、弹簧、床头板和框架。床垫和弹簧应该包装在防虫的包装内。床头板和框架应该经过杀虫剂处理。所有室内家具、墙壁或任何会隐藏臭虫及其卵的地方都应进行除虫处理,臭虫弹("bugbombs")不适用于这种处理,因为它产生的雾粒无法到达臭虫隐藏地。旅行之前行李也应该进行类似的处理,以防将臭虫带入他处。

寄生于蝙蝠或鸟类的昆虫(包括臭虫在内的臭虫家族)可能会暂时感染人或偶然被发现。仅靠人类的血液不可能维持这些吸血臭虫的生命周期,因此,仔细检查房屋应该能发现鸟巢或蝙蝠栖

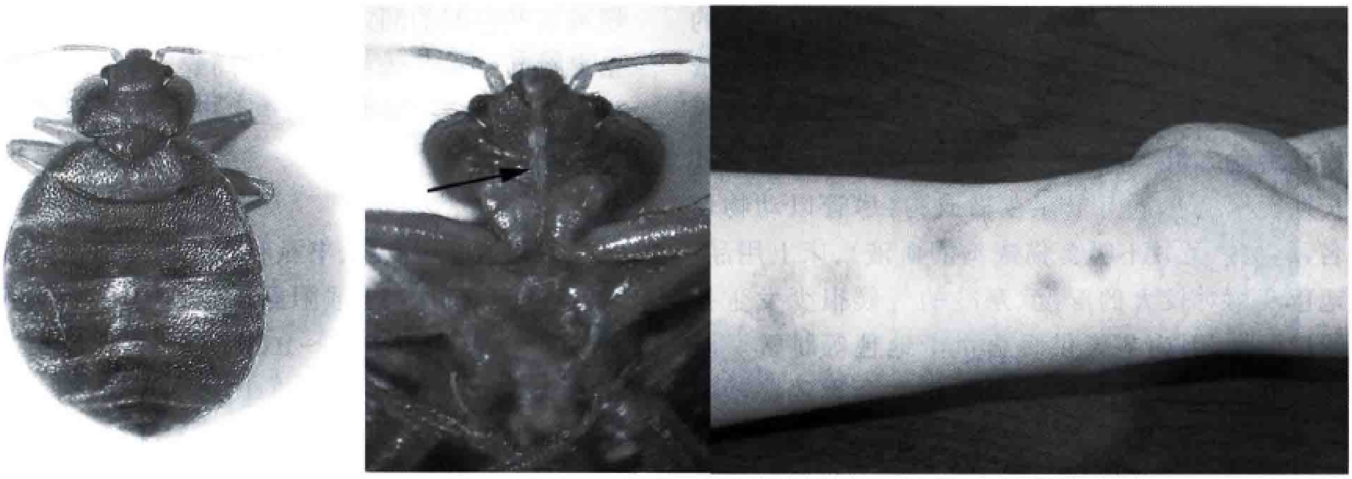


图 151-2　温带臭虫（*Cimex lectularius*），左侧图为背面视图；中间图为腹部视图，显示穿孔/吮吸口器（经允许转载自参考文献[43]）；右侧图，2005 年 12 月在杜邦环岛，华盛顿特区，某四星酒店内被臭虫叮咬后的速发型超敏反应，见彩插

息地的存在。与臭虫侵扰不同，蝙蝠或鸟寄生臭虫可以通过去除作为其来源的巢或栖息地而轻松消除。如果患者坚持认为他们不可能感染臭虫，那么可以请昆虫学家鉴定患者提交的标本（例如，一个孤立的农村家庭，其居住者不旅行，也没有带着行李的旅客居住）。与简单地使用扫帚相比，具体的鉴定可能会消除对专业害虫防治服务的需要。

(三)蚤目

跳蚤体侧扁，具厚重几丁质外壳，无翅，后足极其发达，使其善于跳跃（图 151-3）。跳蚤体型通常偏小，≤5 mm。跳蚤是完全变态昆虫，幼虫蠕虫样，以有机物质为食，成虫排血球状便，排便力大且远。幼虫经历 3 次蜕皮（有三龄），然后吐丝做茧化蛹。雌蚤产卵需要吸食血液，一次血餐足以在宿主毛发中产下数十个虫卵，随后卵与宿主毛发分离，掉落到巢穴中。绝大部分蚤类被称为“巢穴寄生虫”。跳蚤常常生存数月，并每天产卵，但很少能存活 1 年之久。同许多节肢动物一样，跳蚤的生活史同温度和湿度有关，平均 30～75 天可由卵发育到成虫。

目前有正式记录的跳蚤超过 2000 种，绝大多数寄生于啮齿动物，并且具有不同程度的宿主特异性。由于跳蚤通常是巢穴寄生虫，有宿主选择性，并不能长距离迁徙（爬行或跳跃的距离仅数米，即人类必须进入它们的栖息地，才会侵扰），仅只有少数种类具有医学价值。如人蚤（*Pulex ir-*

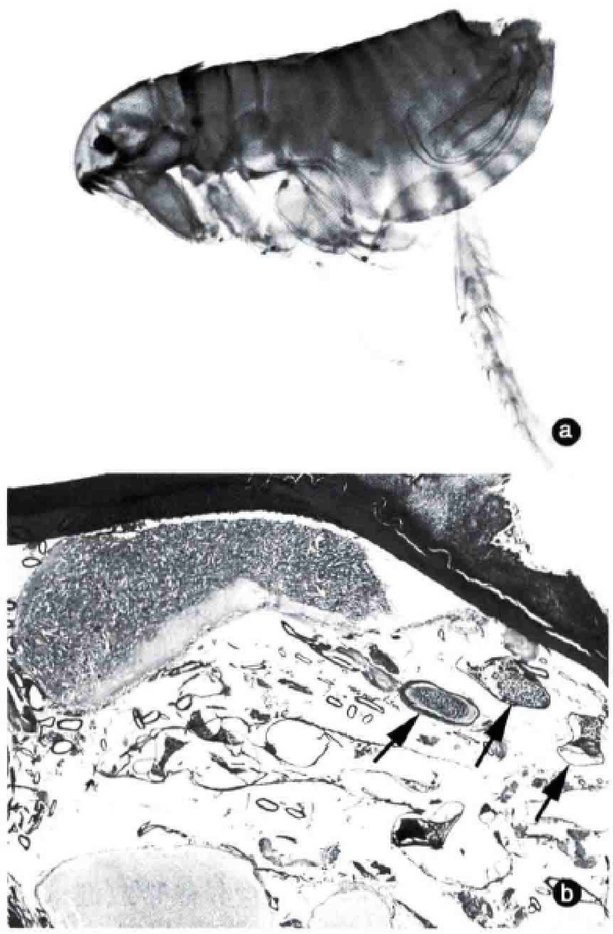


图 151-3　跳蚤

注：a. 猫跳蚤（猫栉首蚤），表现出典型的跳蚤形态特征；b. 来自足部病变的沙蚤（穿皮潜蚤）的组织病理学切片，显示发育中的卵（箭），见彩插

ritans)、狗蚤和猫蚤(犬栉首蚤 *Ctenocephalides canis* 和猫栉首蚤 *Ctenocephalides felis*),主要的鼠疫媒介印鼠客蚤(*Xenopsylla cheopis*)及鸡蚤(*Echidnophaga gallinacea*)。在这些种类中,猫栉首蚤危害最大,其食量大,密集侵袭。家里被其长期侵扰主要是由于存在猫或狗(尽管以动物命名,但这些蚤并不吸食猫或狗的血液)、床上用品、地毯及相对较大的湿度(寒冷的气候很少发生持续性侵扰,因为冬天供暖会烘干地毯等跳蚤所藏身的地方)。虽然持续数周的叮咬会导致典型的迟发型过敏反应,并在叮咬处留下红点(通常在踝关节周围),但每个人的反应不同。个体对节肢动物的吸引存在差异,很有可能出现同一个屋中仅一人被叮咬,而其他人安然无恙。因此诊断蚤类叮咬不能依据家庭是否被侵扰,而是需要每个人都呈现相似病症。

人蚤其实可寄生于多种哺乳动物,包括禽畜类。在热带,屋内卫生条件差,且家禽同人共享居住环境,因此侵扰很容易发生。虽然这种蚤呈世界性分布,但在许多国家猫蚤在逐渐成为人体主要的蚤类害虫。

罕见的跳蚤,穿皮潜蚤(*Tunga penetrans*),依附宿主后长期停留在一个吸血点。其首次发现是在拉丁美洲,目前由于人类活动使得它的分布范围已经穿过撒哈拉,遍布世界各地。这种跳蚤经常穿透到皮肤和指甲,或进入脚底,被感染后称为潜蚤病(图 151-3)。潜入后雌性潜蚤会增大 10 倍,宿主免疫反应使得自身皮肤肿胀从而将其覆盖,仅仅腹部末端暴露在外。通过这个开口,雌虫可以排泄和产卵。当跳蚤死亡,伤口将会继发感染,导致更严重的刺激症状和疼痛。旅行者常因在海滩阴凉地附近赤足而被侵袭。

最著名的跳蚤,东方鼠蚤(*X. cheopis*),是鼠疫的传播媒介。虽然该蚤偏好鼠类(黑家鼠和褐家鼠)为宿主,但当没有鼠(或鼠死亡)时,它们寄生于人或其他动物。该蚤在世界热带或温带港口城市的每只大鼠身上都可发现,并跟随贸易船只运输到此。鼠疫通常通过野生鼠类和特殊的蚤类维持其疫源地。但在越南、马达加斯加及印度,大鼠和印鼠客蚤对鼠疫长久存在非常重要。虽然地方性鼠疫通常是偶发性案例,然而,在适宜的环境中鼠类的高繁殖力就意味着鼠疫可能在城镇大范围暴发,导致成百上千的病例。在美国西部,鼠疫是地方性疫病,患者也许是因为在小工棚、废弃小屋或某些挖掘的洞穴中同地松鼠或其身上的寄生蚤接触而感染。家猫作为中间媒介,将濒死的啮齿动物带到家中并暴露给主人。

(四)虱目

虱目包括树皮虱、书虱和寄生虱。虱的感染称为虱病(头虱和体虱)或阴虱病(阴虱)。虱无翅,腹背扁平,体长,微小(0.4~10.0 mm),常呈现出高度宿主专一性。一般认为有 3 个目:食毛目(嚼虱)、虱目(吸吮虱)和啮虫目(树皮虱和书虱);然而,现在人们认为非寄生虱内其寄生生活已经进化了很多次,这 3 个目合并在一起形成了包含约 4000 种虱的虱目。其中,吸吮虱具有医学重要性,虽然嚼虱也是一类伪外寄生虫,或与复孔绦虫(犬复孔绦虫 *Dipylidium caninum*)有关。大多嚼虱与鸟类共生,而吸吮虱多寄生于哺乳动物。

虱目为不完全变态(半变态型),幼虫同成虫形态类似,常伴随成虫生活。因此,在同一宿主身上采到的样本在体型上差异非常大。所有虱类对温度和湿度都非常敏感,如果没有宿主,将在几天内全部死亡。

嚼虱常常寄生在鸟类羽毛中,以皮肤碎片为食。事实上嚼虱没有刺吸式口器,因此并不吸血。狗咬虱(犬毛虱 *Trichodectes canis*)常与狗共生,并非与“叮咬”有关。狗是犬复孔绦虫的终宿主,绦虫的卵隐藏在其排泄的粪便中。粪便在皮毛上干燥,虱吞下这些卵。绦虫卵孵化后,似囊尾蚴开始聚集在虱血腔中。当这些虱在狗梳理毛发时被偶然摄入时,就可以传播。人(尤其是小孩)抚摸狗,偶然污染手,再通过进食、喝水等行为造成感染。

书虱(啮虫目,也被称为啮虫)同嚼虱形态相像,以发霉的旧书为食。它们常常被怀疑是造成莫名瘙痒的原因,但并不侵扰人和其他动物。

虱目中极具医学重要性的是(图 151-4)头虱(人头虱 *Pediculus humanus capitis*)、体虱(人体虱 *P. humanushumanus*)和阴虱(*Pthirus pubis*)。这些吸吮虱的每条腿上都有突出的爪,用以抓住宿主毛发。它们至少每天吸血 1 次,每次吸血后产 1~10 个卵,并将卵黏附于毛发上(体虱卵黏附于衣物上)。卵或幼虱为圆柱型,并具卵盖,幼虱在 4~15 天内孵化,经历 3 个虫期,每个虫期历时 3~8 天。

虱通过宿主身体接触，体虱也可通过共穿衣物传播。学校是虱子传播的最佳地点，学生不但分享帽子和围巾，并且在玩耍时也会导致传播。短暂的接触，如地铁上短暂的头靠头行为，也可能造成传播。由于身体、头部和阴部的虱在离开人体寄主后不会存活很长时间，因此不太可能从无生命的物体上获得。眉毛上出现阴虱意味着由性接触传染，而儿童感染阴虱有可能是因为虐童导致。

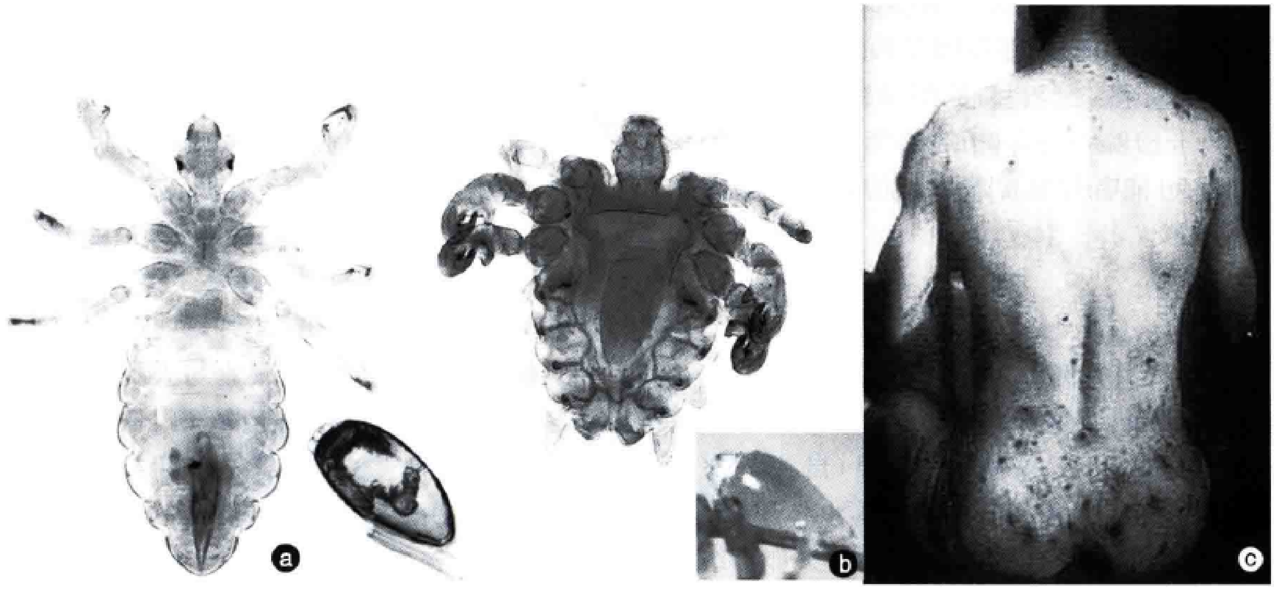


图 151-4　a. 头虱和体虱。b. 阴虱。人虱的长度大于宽度，其胸部比腹部窄，并且每条腿的爪子大小相同。阴虱的宽度几乎与长度相同，胸腔比腹部宽，腹部的侧面隆起，中腿和后腿的爪子比前腿大。有一个凸起的圆锥形小孔。c. 体虱病。被身体虱子感染的人的躯干由于抓挠而变得色素沉着和角化过度（由 Department of Tropical Public Health，Harvard School of Public Health，Boston，MA 提供），见彩插

体虱和阴虱叮咬对皮肤产生持续数天的强烈刺激，每个叮咬点均会出现红疹。长期反复叮咬会使得宿主脱敏，或发展为非特异性发热病，伴随淋巴结病变、水肿及关节病变（这些体征和症状与战壕热类似），个别长期受叮咬的个体可能会发展为“流浪者疾病”或寄生虫性黑皮病（图 151-4），身体皮肤变厚及黑色素沉着。

虽然体虱或阴虱感染也许是卫生条件差所致，但头虱感染并非如此，在卫生非常好的家庭中也会感染头虱。头虱感染既不是一个公共卫生威胁也不是临床性难题。很少有感染大量头虱而致病，并且头虱并非媒介生物。但是，很多学校会采取非常极端的方法直到彻底清除儿童头发上的所有幼虱。许多这样的学校并不能区分这些虫体是否存活，坚持清除所有幼虱痕迹，然而，彻底清除所有幼虱残余是非常困难的，主要依靠齿梳非常密的梳子完成，这类梳子在埃及法老的坟墓中就已存在[8]。

吸吮虱既是重要媒介也属于害虫。历史上最臭名昭著的是体虱，其可传播流行性斑疹伤寒、战壕热和虱传回归热等。拿破仑 1812 年侵入俄国时就受到流行性斑疹伤寒的阻挠，使他损失了 1/10 的兵力。第一次世界大战后，据说在俄国和罗马尼亚因流行性斑疹伤寒而死亡的人数大约有 80 万[9]。体虱与糟糕的卫生条件有关，一般在冬天或难民营中，无家可归的人不换衣物或很少换洗导致的。战壕热常见于无家可归的人，而最近一次于布隆迪和卢旺达的难民中大暴发。奇怪的是，尽管头虱与它同种，并且在实验室条件下也可为疾病媒介，但其与这些感染无任何流行病学上的联系，阴虱也如此。

通过勤换衣服和勤洗澡可有效控制体虱。被感染的人换下的衣物应销毁，或小心地用塑料袋包裹后，放置数周，至所有体虱饿死。衣物也可用热水洗涤后，在热烘干器下烘干至少 30 min。治疗阴虱应将阴毛剃光，并勤换内裤，或采用治疗头虱的办法，使用局部灭虱药。尽管阴虱病的报道因阴梳的普及而减少，但提出的证据是简单的相关性分析，而未确证。阴虱可能在其他毛发上存活。头虱可以通过专门设计的虱梳进行清除，但使用杀虱剂治疗更为有效。如果上述措施都无效，则必须使用新一代的处方灭虱药。一次局部使用伊维菌素虽然有一定抗药性，但含有扑灭司

林或马拉硫磷的灭虱药仍然是治疗头虱的首选，同时处理环境卫生(熨烫床上用品和衣物，尤其是帽子，真空处理坐垫和床垫)，并检查家人及亲友是否感染。由于局部灭虱药对幼虫效果不理想，因此应该在用药1周后再次用药。单次局部应用伊维菌素(0.5%)或局部应用多杀菌素(0.9%)可有效清除头虱感染[10]。口服伊维菌素(单剂量为200～400 mg/kg，<15 kg的儿童和未怀孕的女性)对那些可能有局部皮肤敏感的人是一种有效的药物治疗。

(五)蜱螨目

蜱螨类是蛛形纲下的一个亚纲，其中也包含蜘蛛。蜱螨目包含螨和蜱，为体型微小或小型的节肢动物，幼虫和成虫都有八条足(昆虫是六条足)，与昆虫体的3个部分不同，其虫体不分节。蜱螨目身体分为两个功能部分：颚体(头部)，组成头部；躯体部，发挥其余功能(繁殖、运动和消化)。它们经历不完全变态，在性成熟前经历1个幼虫期和一到数个若虫期。螨的种类非常多，已鉴定的大约有45 000种。它们跻身于最原始的陆生动物之中，最早的化石记载是在泥盆纪(距今4亿年前)，发现于地球上的任何生物栖息地之中。包含两个主要的目：真螨目和寄螨目。前者包含两大类：疥螨亚目(无气门亚目)和恙螨亚目(前气门亚目)，这两类都包含具有医学重要性的物种(图151-5)。后者包含3个亚目：巨螨亚目、蜱亚目和中气门亚目。这3类中，仅后2类具有医学重要性。巨螨亚目包含大概20种，并仅存在于大洋洲和一些新热带区森林中，很难与人类相遇(人类误食这类螨虫会导致瘫痪)。中气门亚目(如皮刺螨或革螨)一些种类侵袭鸟类或啮齿类，某些情况下侵袭人类并引起瘙痒。硬蜱由多种本质上是大型螨类的蜱类构成。

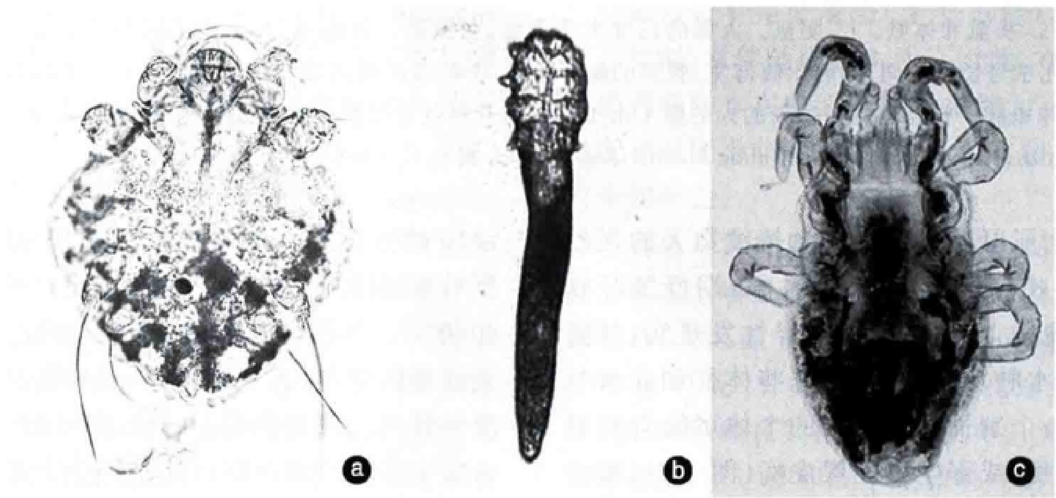


图151-5 a. 人痒螨，疥螨；b. 毛囊螨，毛囊蠕螨；c. 北方鸟螨，北方刺脂螨(*Ornithonyssus sylviarum*)[42]，见彩插

除了扁虱和一些中气门亚目种类，螨一般不被认为是人类病原的媒介，它们的危害主要是引起骚扰、皮炎及过敏。

家鼠螨[红刺脂螨(*Liponyssoides sanguineus*)]是立克次痘疹的媒介，传播小株立克次体。属于较温和的疾病，主要症状是发热和皮疹，该病于20世纪40年代在纽约Bronx区Kew林园的一次垃圾工人罢工后首次报道[11]。垃圾堆积导致家鼠种群增长。当垃圾堆被清理后，很多家鼠死亡或迁徙，留下大量饥饿的螨虫。在欧亚大陆和澳大利亚东北部，恙螨属是恙虫病[恙虫病东方体(*Orientia tsutsugamushi*)]的媒介。在智利海岸外的一个岛屿上发现了一个恙虫病的集中地，这说明其分布不仅仅局限于已知的古北区重点地区。大约有30亿人居住在恙虫病的流行区内，某些微小的(0.2 mm)恙螨幼虫[如地里纤恙螨(*Leptotrombidium deliense* 或 *Leptotrombidium akamushi*)]会传播恙虫病。感染病原的恙螨叮咬后会留下焦痂，并诱发近端淋巴结病、发热、头痛、皮疹及肌肉痛，病死率为5%～35%。有趣的是，这类螨的若虫和成虫以腐屑或其他节肢动物为食，并不吸食脊椎动物的血液。因此，恙虫主要是

经卵巢孵化或垂直传播(通过卵传代)。非感染的幼虫吸食被感染的啮齿动物宿主血液后,会作为母系产生下一代感染性螨虫。所有其他媒介相关病原体都有很大的机会通过叮咬感染的宿主或进食多次血餐进行水平传播。

螨类极难鉴定,尤其是尘螨或一些随处可见自由生活的螨虫非常容易混淆。鉴定和计数都应在复式显微镜下于玻片上进行操作。

蜱被认为是除蚊虫外节肢动物中最高效的媒介生物,可传播多种疾病,其传播的疾病数量远远超过其他节肢动物。目前所知的大约 900 种蜱都需要血液才能发育和繁殖。医学上具有重要价值的种类(图 151-6)包括硬蜱科和软蜱科。第三类,纳蜱科,由南非一个单一种类的软蜱组成,其与病原体的关系尚未被描述。硬蜱由于其躯体背面有壳质化较强的盾板而得名。雌性硬蜱的盾板位于躯体的前 1/3,剩余部分由褶皱的革质表皮组成,允许其在进行血餐时可进行极大的舒张。雄性硬蜱的盾板覆盖着整个躯体,几乎从不进食。与硬蜱相比,软蜱无硬化盾板,整个身体为革质。

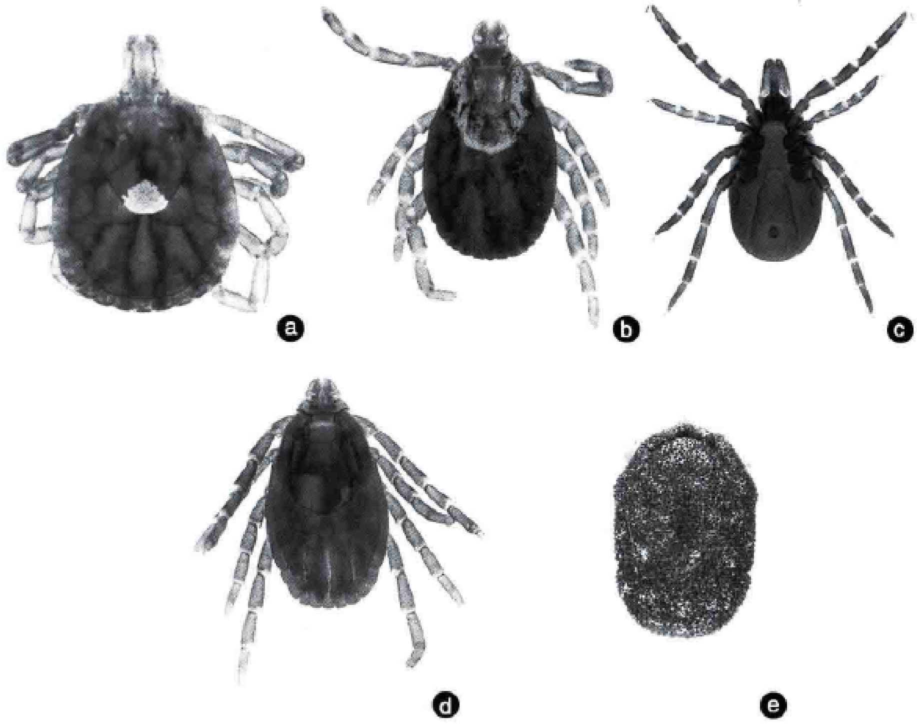


图 151-6　美国医学上重要的蜱

注:a. 孤星蜱,美洲钝眼蜱;b. 美国犬蜱,安德森革;c. 黑脚或鹿蜱,肩突硬蜱或达米尼硬蜱;d. 褐色犬蜱,血色扇蜱;e. 软蜱,墨西哥阿瓜斯卡连特斯钝缘蜱(图片经允许改编自参考文献[43]),见彩插

蜱的头部也称假头,作为感受器官,由口下板、螯肢(与昆虫的上颚相似)及覆盖口器(口下板和螯肢)的触须组成。螯肢作为剪切器官,两侧相对滑动,末端的切牙可在宿主皮肤上造成伤口。口下板进而插入皮肤,由于具有内弯的反向小齿,整个蜱体可以锚定在皮肤上(图 151-7)。许多硬蜱会分泌胶状物在口下板周围。通常,当要从宿主身上移除一个附着的犬蜱(美洲大革蜱 *Dermacentor variabilis*),大片皮肤也会随着口下板脱落,主要是胶状物和周围的皮。因此,由于这些胶状物的原因,当被移除后,蜱的口下板几乎都是不完整的。蜱的头留在皮肤中不是什么很严重的事,多数时候这些残留物通过抓挠等被清除体外。因此,对这类情况的治疗只需要简单的在叮咬处消毒即可,并不需要在伤口中寻找其头部。软蜱取食时间短,很少存在附着现象。

硬蜱需要数天的时间完成血餐,持续时间与种类及发育阶段相关。北美鹿蜱(*Ixodes dammini*),常被称为肩突硬蜱(*Ixodes scapularis*)[12],幼虫期 3 天,若虫期 4 天,雌性成虫期 7 天。其近亲欧洲蓖麻子蜱(*Ixodes ricinus*),幼虫期 2 天,若虫期 3 天,雌性成虫期 7 天。吸食持续时间也取决于宿主的免疫状态(叮咬前期会导致速发型过敏反应,这将降低取食速度)和温度[达米尼硬蜱(*I. Dammini*)或

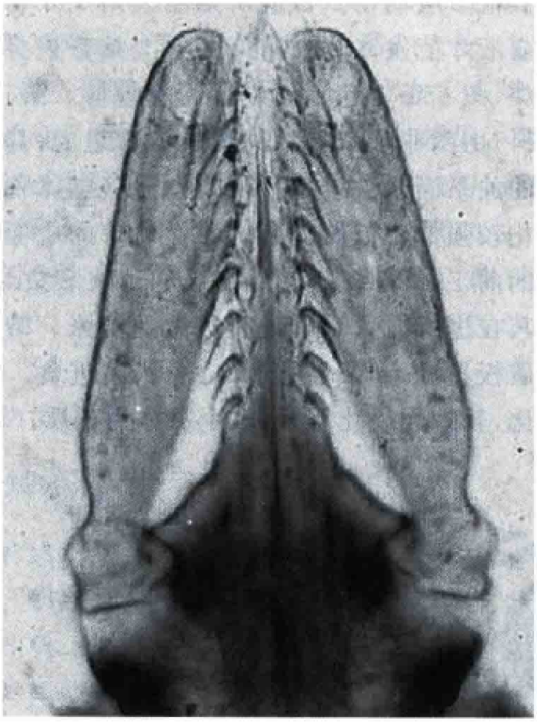


图 151-7 蜱口下板及下弯的栉齿，见彩插

蓖子硬蜱（*I. ricinus*）在冷血爬行动物身上取食时间是在体温为 37℃的动物上的 2 倍]。取食时间的延长需要软化表皮角质层，以使躯体能承担 10～100 倍体重的血液。叮咬部位是特定的，以便吸取相应的血液和淋巴液。在取食行为的前 70%阶段，蜱取食的血液和淋巴液较少，其背腹板仍平坦。血红蛋白从肛门排出，脂肪保留下来，而血液中的水分被转化为唾液返回到宿主体内[13]。在最后 1 天，一般在血餐最后的 3～4 h，蜱会“吸食一大口”，然后从宿主身上脱落。

由于硬蜱必须在宿主身上停留数天，因此它们必须进化出使宿主暂时抑制局部炎症反应的方式。硬蜱唾液是抗凝剂，为抗炎症应答因子和抗止血因子的混合物[14]，同时可系统地中和 Th2 应答。宿主如从未被蜱叮咬过，则不会意识到蜱的叮咬，甚至大多数莱姆病和落基山热患者根本不知道被蜱叮咬过[15-16]。最危险的蜱虫不一定是患者发现并移走的那只，因为它已中断了传播过程，而是患者不知道的且能够完成喂食的那只。

与硬蜱不同，软蜱的叮咬与蚊虫类似，吸血时间一般十多分钟，不会超过几个小时，并常常在宿主睡眠时进行。软蜱唾液成分不需要非常复杂，甚至有些软蜱的叮咬会有疼痛感。分布于加利福尼亚和墨西哥的皮革钝缘蜱（*Ornithodoros coriaceus*），是有名的“毒蜱”，可造成局部剧痛和灼烧感。

蜱的生活史非常长，通常是数月或数年。如鹿蜱，发育成熟需要 2 年时间。因此，人们普遍认为，当蜱吸饱血从宠物身上掉下并落在宿主家里后，就不再具有任何危险性。饱血的蜱不再二次取食，并将花数周时间蜕皮或产卵，在这期间，室内较低的相对湿度使得蜱无法生存。另一方面，猫相对于狗而言对莱姆病传播的风险更高，也许是因为鹿蜱更喜欢攀附于狗身上，而猫身上的蜱，尤其是若蜱，进食过程中容易脱落而攀附于猫主人身上[17]。当然，蜱在室内吸血或掉落后危险降低的情况也有例外，如棕色狗蜱血红扇头蜱（*Rhipicephalus sanguineus*），是马赛热（地中海斑点热，南欧斑疹热）和犬艾希体的媒介，最近发现可传播落基山斑点热。这些蜱藏于墙体后蜕皮，并在狗舍的内墙内大量存在。

依据蜱的充血状态及口器完整性很难鉴定蜱种。鉴定的必要性在于所提交的标本是否与疾病相关，在这种情况下，将其归为属可能有助于鉴别诊断。尽管近期蜱类学家对一些俗名进行了更正，但一般来讲，利用经典的 CDC 口器和躯体图表可在种属水平上鉴定蜱种（图 151-8）。通常，一般知道某个蜱来源于哪个国家，就可极大缩小鉴定的范围（表 151-2）。

二、节肢动物作为“标尺”

媒介同病原体是直接对应的。然而，有些节肢动物-病原体之间并非直接对应关系。节肢动物偶然作为传染源来源时的现象，借用数学术语可称为“标尺”[18]。蠕虫可以把节肢动物作为中间宿主，但节肢动物的专性行为（如吸血）并不会传播感染性的蠕虫。饮用水中的剑水蚤体内有麦地那龙线虫（*Dracunculus medinensis*）三期幼虫，这些桡足类在被胃酸消化后会释放线虫幼虫，导致麦地那龙线虫感染。然而，如果桡足类昆虫并不会游向饮水处。因此，患者的病史问询应按如下程序进行：饮用了自然水源的可能性（桡足类和线虫）；是否接触过面粉虫、蚤或蟑螂（绦虫、犬绦虫、筒线属）；是否食用过蟹类或小龙虾（并殖吸虫属）；或在家蝇密度大的环境中停留（沙眼）。除了家蝇和沙眼外（沙眼病原体通过眼分泌物传播），其他所有的节肢动物和病原体之间都存在专性关系。

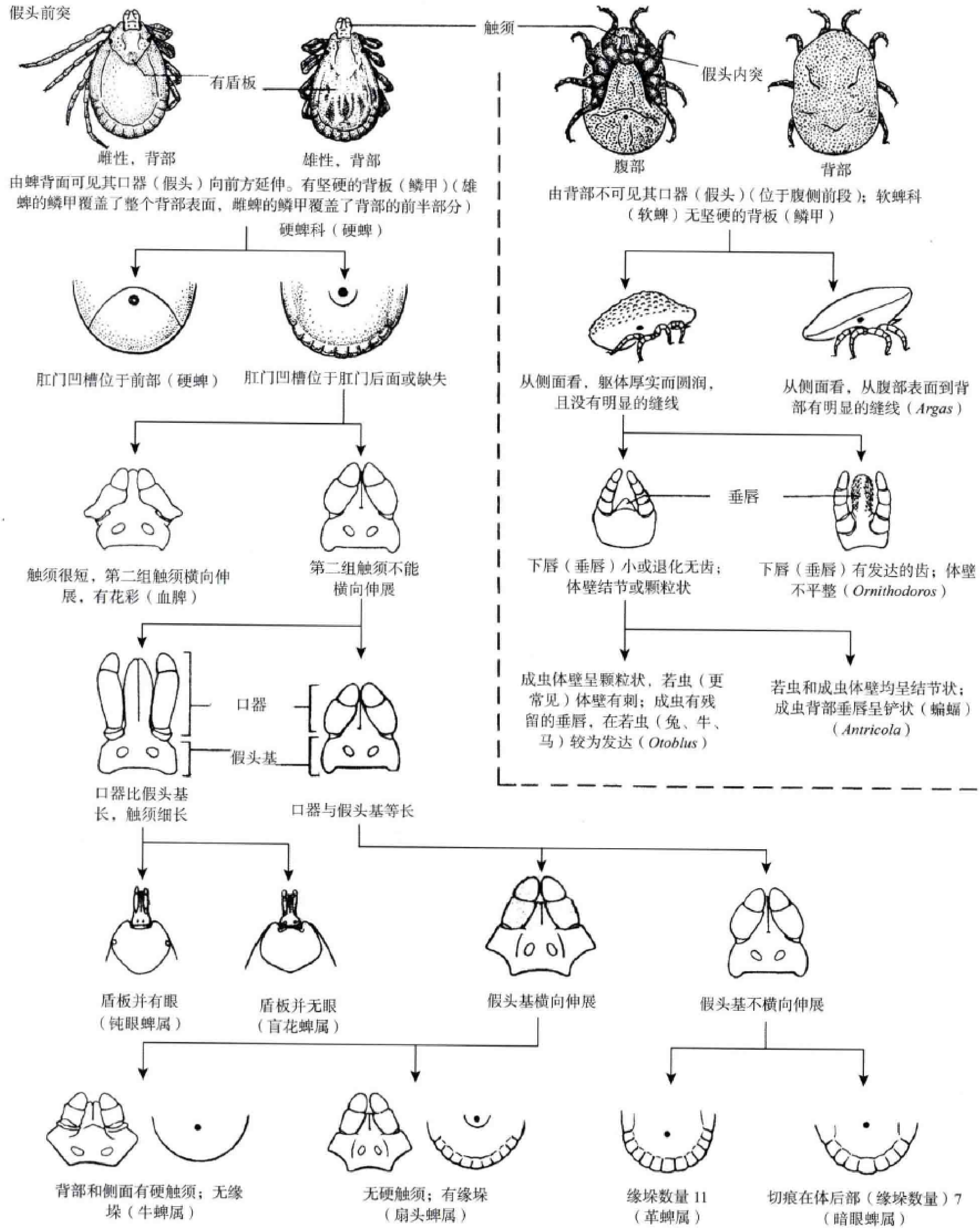


图 151-8 美国主要蜱类特征

表 151-2　全球范围内可能叮咬人类的蜱和可能的蜱源性感染

区域	可能侵袭人类的蜱	可能的人畜共患病[a]
北美洲	达(米尼)氏硬蜱(Ixodes dammini)，肩突硬蜱(*Ixodes scapularis*)，太平洋硬蜱(*Ixodes pacificus*)，有齿硬蜱(*Ixodes dentatus*)，库(克)氏硬蜱(*Ixodes cookei*)，安德森革蜱(*Dermacentor variabilis*)，安德森革蜱(*Dermacentor andersoni*)，西方革蜱(*Dermacentoro ccidentalis*)，美洲钝眼蜱(*Amblyomma americanum*)，斑点钝眼蜱(*Amblyomma maculatum*)，赫姆斯钝缘蜱(*Ornithodoros hermsi*)，墨西哥阿瓜斯卡连特斯钝缘蜱(*Ornithodoros turicata*)	莱姆病、巴贝虫病、HGA、波瓦生热、RMSF、CTF、野兔热、马斯特斯病/STARI、RMSF、土拉热病、HME、human ewingii ehrlichiosis、回归热
南美洲	卡延钝眼蜱(*Amblyomma cajennense*)，纯绿蜱(*Ornithodoros*)	RMSF、回归热
欧洲、俄罗斯	蓖子硬蜱(*Ixodes ricinus*) 全沟硬蜱(*Ixodes persulcatus*) 边缘革蜱(*Dermacentor marginatus*) 血红扇头蜱(*Rhipicephalus sanguineus*)	莱姆病、巴贝西虫病、HGA、TBE TIBOLA 马赛热、HME?
日本，中国，韩国	卵形硬蜱(*Ixodes ovatus*) 全沟硬蜱(*I. persulcatus*) 革蜱(*Dermacentor* spp.) 血蜱(*Haemaphysalis* spp.)	莱姆病、巴贝西虫病、HGA、TBE、蜱斑疹伤寒、JSF？ JSF?
南亚	血蜱(*Haemaphysalis* spp.) 璃眼蜱(*Hyalomma* spp.) 血红扇头蜱(*R. sanguineus*)	KFD、CCHF、蜱斑疹伤寒
东南亚	粒形硬蜱(*Ixodes granulatus*)， 血红扇头蜱(*R. sanguineus*)	莱姆病? 蜱斑疹伤寒? HME?
澳大利亚	全环硬蜱(*Ixodes holocyclus*)	蜱斑疹伤寒
北非	璃眼蜱(*Hyalomma* spp.) 血红扇头蜱(*R. sanguineus*) 蓖子硬蜱(*I. ricinus*)	CCHF 马赛热，HME? 莱姆病
西非	璃眼蜱(*Hyalomma* spp.) 钝缘蜱(*Ornithodoros erraticus*) 彩饰钝眼蜱(*Amblyomma variegatum*)	CCHF 回归热 ATBF
撒哈拉以南非洲地区	彩饰钝眼蜱(*A. variegatum*) 希伯来钝眼蜱(*Amblyomma hebraeum*) 犬血蜱(*Haemaphysalis leachi*) 血蜱(*Hyalomma* spp.) 毛白钝缘蜱(*Ornithodoros moubata*)	ATBF CCHF 回归热

注：[a]HGA. 人粒细胞无形体病(*Anaplasmaphagocytophilum*)；HME. 人单核细胞埃立克体病(由沙费埃里希体或犬埃里希体引起) RMSF. 落基山斑疹热；STARI. 南部蜱相关皮疹疾病(病因不明，可能是疏螺旋体属)；CTF. 科罗拉多蜱传热；TIBOLA. 蜱传播淋巴结病(斯洛伐克立克次体)；JSF. 日本斑疹热(日本立克次体)；TBE. 蜱传脑炎；CCHF. 克里米亚-刚果出血热；KFD. 夸赛纳森林病；ATBF. 非洲蜱叮咬热(非洲立克次体)

(一)蝇

双翅目包括家蝇、厩蝇、丽蝇及麻蝇。这些蝇类都在特定的地方产卵和发育，即家蝇在粪便中，厩蝇在腐烂的植物中，丽蝇在鲜肉中，麻蝇在腐肉中。这些蝇类都能在短时间内大量繁殖后代：如一个雌性家蝇在潮湿腐烂的有机物中一次可产卵100～150个，一生可产卵超过20次[19]。卵在12 h内孵化出幼虫，1周可完成3个幼虫阶段后成蛹。蛹4天可羽化出成虫，一天内完成交配。因此，一个完整的生活史可能只需要12天即可完成。

家蝇因其与较差的卫生条件相关而关注较多，可作为生物标识。苍蝇善于飞行，可以很容易从户外飞进屋内。其喙部顶端的肉质结构，以及多毛的身体和腿，提供了污染的表面。另外，苍蝇在取食的同时反刍，呕吐物包含前次黏附所需的物质。家蝇常常以人类粪便为食，因此在其体内和体表几乎可检测到每一种可能的肠道病原体(这些病原体可导致阿米巴病、霍乱、伤寒、甲型肝炎、脊髓灰质炎、蛔虫病和幽门螺杆菌感染等)。但是从流行病学角度来说，没有苍蝇的环境这些病原体也同样存在。如在脊髓灰质炎病毒流行区捕获的苍蝇身上能发现这种病毒[20]，但使用DDT

处理后并不能降低该病的流行。然而,军队帐篷上残留的DDT可以降低细菌性痢疾的发病率[21]。有可能个别肠道疾病的病例是因为食用了被苍蝇污染的食物,但这种情况带来的风险是否值得患者或相关医务工作人员担心,则还不明确。高密度的苍蝇侵袭应得到控制(清除源头,如消除垃圾和粪便),但家中出现少量苍蝇并不值得大费周章。

(二)蟑螂

蟑螂是一种背腹扁平、身体光滑、具翅、触角长、咀嚼式口器和具尾须的昆虫。外翅坚硬厚重,内翅膜质。蟑螂可以飞,但平常以其长而多刺的足疾跑。蟑螂为不完全变态昆虫,幼虫形态与成虫相似,但无翅。成虫将卵产生在一个坚硬的囊中,称为鞘,产于黑暗的裂隙中。发育缓慢,每次蜕皮一般需要 4 周,许多蟑螂 1 年只产卵 1 次。蟑螂在无食物的情况下可存活数月,但水是必需的。蟑螂杂食,食谱差异大,通常在夜晚进食。可通过气味腺分泌信息素(追踪和聚集素),这些令人讨厌的气味甚至在无蟑螂检出时也存在。蟑螂大小一般从半寸(德国小蠊),到几乎两寸(美洲大蠊)。许多研究都将蟑螂作为标识,预估在一个德国小蠊体表存在 14 000 CFU 的细菌(主要是葡萄球菌)。美洲大蠊取食大约 200 μl 曾发现霍乱弧菌的粪便,30~80 h 后,霍乱菌恢复活性[22]。线虫(美丽筒线虫属)一般感染有蹄类动物,但蟑螂会携带线虫,并污染其取食过的食物,当人类食用被污染的食物后会造成感染。人类同样会感染一种人畜共患的棘头绦虫(念珠状念珠棘头虫),它利用蟑螂和其他节肢动物作为中间宿主。同苍蝇类似,蟑螂的出现暗示环境卫生较差,但通过蟑螂传播肠道疾病的例子极少。

蟑螂在公共卫生领域的重要性在于它是引起哮喘的主因,与可导致哮喘、鼻炎或皮炎的尘螨同样重要。蟑螂粪便中有过敏原 Blag1 和 Blag2,可与一些过敏原产生交叉反应,如真菌和尘螨、甲壳类或软体动物身上的原肌球蛋白等[23]。对蟑螂变应原过敏的患者,常常(高于 70%)产生与相对分子质量为(20~90)×10^3 的 Bla g1 蛋白反应的特异性 IgE。虽然过敏反应是引起(蟑螂幼虫)粪便相关鼻炎的主要原因,但引起呼吸道炎症并不需要首次暴露的刺激。

与蟑螂的密切接触会加快呼吸道疾病的发展。因此,发现活蟑螂时应伴随启动控制措施。控制蟑螂出没比较困难。可将硼酸沿墙体、线脚后方或其他可能藏匿的地方喷洒,可通过损伤蟑螂腹节之间的角质层,使其脱水,从而有效杀死成虫和蛹。除去积水(将水槽擦干净并去除水槽周围的杂物)阻止其接触水也能够减少侵扰。蟑螂侵扰在学生和移民公寓中最为常见,它们会随家庭用品一起被带至公寓中。

三、节肢动物造成的直接损伤

(一)节肢动物通常被认为是传播载体

媒介例如虱、蜱、臭虫、蚤、蚊虫和蚋等通过它们的叮咬或其唾液成分引起过敏反应或毒性作用直接引起宿主损伤。过敏反应主要表现为瘙痒,伴有搔抓引起的继发感染。臭虫和蚤叮咬可能引起速发型过敏反应,伴有直径>3 cm 的发痒红斑(图 151-2)。蜱叮咬可能诱发局部慢性肉芽肿,并持续数月,可能是由残余口器(细齿)遗留在表皮层内导致的。这一现象最常见于"幼蜱"侵袭(易见于钝眼蜱属花蜱幼虫,通常其数量数以千万),成百上千的蜱依附着于环线处。利用炉甘石(或炉甘石与苯那君)洗液或非常热的自来水中浸泡伤口可引起肥大细胞脱颗粒从而可以立即缓解瘙痒。

非处方药氢化可的松软膏可帮助缓解轻度瘙痒,但重度病例则需要使用处方药物类固醇软膏(例如 0.05% 倍他米松)。每日使用氢化可的松可在 1 周内促进瘙痒症状消退。使用维甲酸 A 凝胶(0.05%)治疗蜱肉芽肿,可促进表皮再生和残余抗原物质的排出(个体观察结果)。

如在双翅目介绍中所提到的,蚋叮咬会产生"蚋热",严重程度与叮咬次数相关。通常,叮咬的部位会出现水肿,并伴有高尔夫球大小的肿块及点状渗出病灶。夜晚出现发热和肌痛,24 h 内症状消失。这些症状不应当作感染对待;仅有少量病原体时会出现这样的短潜伏期,仅需对症治疗。类似的,由于皮革钝缘蜱或非洲毛白钝缘蜱等软蜱叮咬能够立即在叮咬部位引起疼痛、肿胀和刺激,然后出现较硬的风疹块[24]。叮咬反应会持续数天,作用部位会出现"应激性"反应。据说新英格兰北部和五大湖区上游的猎人初冬时会发生白纹革蜱的叮咬(通常只叮咬如鹿或麋等有蹄类的

一个物种);《新约》指出美洲土著人称这些幼虫为"火一样的叮咬者",目前尚未对这一情况进行研究。

由于蜱叮咬引起的罕见中毒称为蜱麻痹。一些饱餐蜱会诱导急性麻痹加重。1843 年澳大利亚在绵羊和牛中首次发现了这种病例,1912 年俄勒冈报道了一例类似儿童疾病。澳大利亚全环硬蜱叮咬牛、绵羊和犬类,但是极少叮咬人类,因此蜱麻痹临床上并不常见。然而,在美国西部出现了安氏革蜱叮咬牛或绵羊导致蹒跚的病例,最终结果显示这种叮咬可能是致命的。儿童往往是蜱麻痹的受害者,蜱易攻击颈部,所以疾病特征为乏力、过敏、远端感觉异常、下肢无力并伴腱反射降低、共济失调和昏睡等。将蜱移除后四肢麻痹和呼吸衰竭症状才可能消除;未采取治疗的病死率为 10%。移除蜱后 48 h 内可见惊人的恢复效果。(蜱生物学家暗示这可能是白雪公主故事中所涉及的致病源,在王子俯身亲吻她之后便苏醒过来的原因可能是王子移除了白雪公主耳后的蜱。)由全环硬蜱(*I. holocyclus*)分离得到的毒素名为全分裂素,相对分子质量为$(40\sim60)\times10^{3}$[25];目前生产用于兽医工作,同时也分离得到了其他分子量较小的抗毒素,尚未从美国多毛硬蜱中分离得到毒素。也有其他蜱类(美洲钝眼蜱、硬蜱属)引起蜱麻痹的相关报道。

在美国东部出现了与孤星蜱叮咬有关的红肉过敏事件,欧洲和澳大利亚也有类似的报道,绵羊蜱(蓖子硬蜱,*Ixodes ricinus*)和副蜱(全环硬蜱,*Ixodes holocyclus*)分别被怀疑为原因。由于 IgE 识别半乳糖 α-1,3 半乳糖(α-gal),采用西妥昔单抗治疗会产生的严重过敏反应,但其具有地理局限性。这种 IgE 反应也被认为与新发的牛、羊肉过敏症有关,表现为摄食牛肉、猪肉或羔羊肉后,出现荨麻疹或过敏性反应,并持续 3～6 h。症状的延迟出现将这种红肉过敏与其他食物过敏区分开来。根据患者回忆曾受到多种蜱叮咬,随后详细回顾个人病例、抗 α-gal IgE 与孤星蜱之间存在流行病学相关性,以及 IgE 和蜱蛋白与 α-gal 存在相互作用,这些研究为二者间的因果关系提供了证据[26]。大多数患者的血型不是 B 型,这在生物学上与 α-gal 和 B 血型决定因素的结构相似性是一致的。α-gal 是蜱体内组织的主要组成部分,因此这些联系存在生物学合理性。除了避免吃红肉和蜱叮咬外,无特殊治疗方法;显然,解决过敏症需要避免蜱再次叮咬。这种由于节肢动物导致的不常见的、直接且滞后的损伤案例仍需进一步研究。

(二)体内寄生节肢动物

节肢动物可侵入宿主体内并引发疾病的包括螨(疥疮)、蚤(潜蚤病)、苍蝇幼虫(蝇蛆病)和舌形虫(哈耳宗病)。潜蚤病在蚤目中已有叙述。舌形虫或五口动物是原始、长形节肢动物,以成虫形式在肺部和气管中存活,宿主包括鱼类、两栖动物、爬行动物和一些哺乳动物。虫体类似于螨类,由头胸部和不易区分的腹部组成,无腿;通常,表皮为环状或有环纹。头部突出几丁质钩。虫体大小为 1～10 cm。虽然长久以来分类于舌形虫内,但目前基于形态学和分析特征将其归为甲壳类,并且认为与鱼虱关系最近[27]。舌形虫具有不完全发育的复杂生活史,需要中间宿主,若虫阶段形成包囊。

锯齿状舌形虫感染是由于摄入了虫卵(来自犬类中间宿主的鼻涕污染)或摄入了来自中间宿主如兔、牛或羊的生的或未煮熟的肝、肺或肠系膜内携带的包在囊中的若虫[28]。导致的鼻咽综合征,即众所周知的中东地区哈尔宗病和苏丹的马拉拉综合征。这可能是由幼虫移行至鼻咽会引起面部水肿、流鼻涕、咳嗽和喷嚏等。去除这些讨厌的若虫(通过可视化检查和手术镊)并以抗组胺药进行治疗可有效减轻水肿。腕带蛇舌状虫和响尾蛇孔头舌虫(*Porocephalus crotali*)同样可以引起人类感染,可能是由于饮用了含虫卵的蛇粪便污染的水源,而不是吞食未煮熟的蛇肉造成的。通常,人类感染仅在尸检时或在 X 线片上发现腹部或肺部钙化灶时才被注意到,需进行对症治疗。

体外寄生虫引起的最常见直接损伤是由人疥螨(疥螨属)引起的疥疮。大部分不同类群的疥螨因其对于其他动物(包括犬、猪、绵羊、牛和山羊)的趋向性被当成一个种,但都可通过形态进行鉴定。疥螨侵袭可在世界各地发生。犬疥癣通常与狗主人的非典型疥疮感染有关,来自犬类的螨虫不能在人身上存活,它们会形成丘疹状的病变,这可能是由死亡虫体造成的[29]。动物或人的疥疮都是通过直接的人人接触传播,通常发生于人群聚集区,尤其是在家庭内部。很少有证据表明存在环境污染,且污染物尚未确定。

雌螨在角质层下挖隧道(图 151-9),在隧道内

产卵及排泄粪便，产下几十个虫卵，并在 1 周内孵化。幼虫形成新的孔道，但也会出现在皮肤上并自由移动。若虫从幼虫开始发育，它们依次发育成雄性成虫和雌性成虫。正常侵染包含 10 只或 20 只雌性螨。在初次感染后 1 个月内出现夜间瘙痒症状，但在以前有过感染的个体，可能在感染 1 天内就出现夜间瘙痒。因此，新感染者，通过出现瘙痒判定为感染之前就已经传播给其他人了。红斑丘疹和小囊泡最先出现于手指指腹，蔓延至胳膊、躯干和臀部。藏身处含有粒状、抗原性高的粪便，可引起迟发和速发型过敏反应。有意思的是，在免疫缺陷的人中，可以发现成百上千的雌性螨，虽然瘙痒症状较轻，但是过度角质化非常明显。这种"结痂"或结痂性疥疮对他人具有高度传染性。

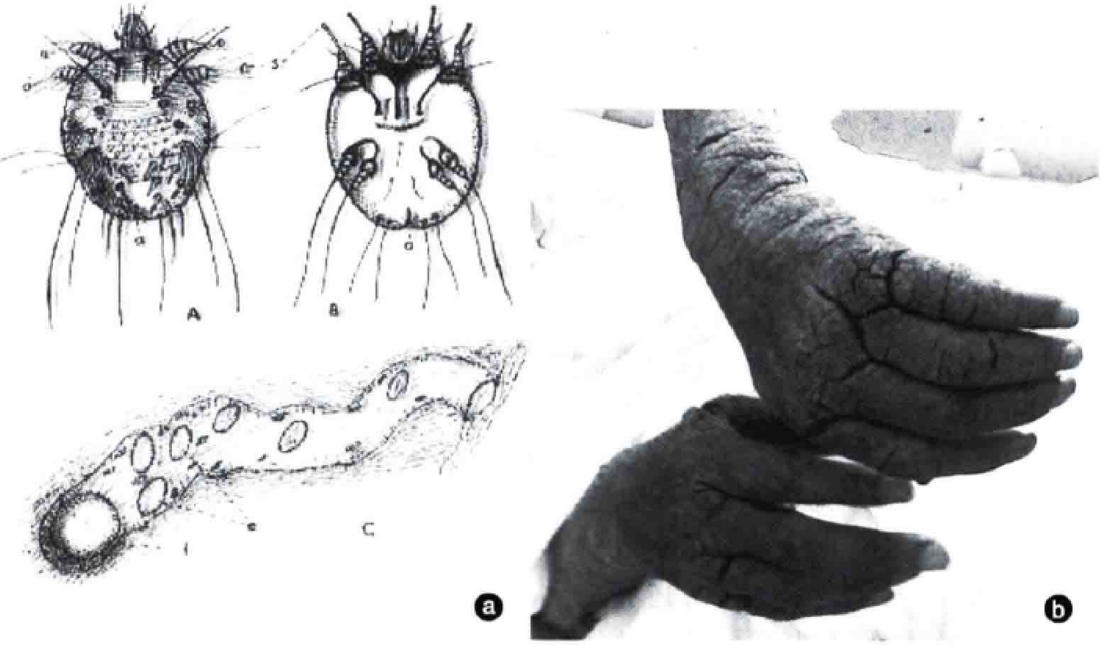


图 151-9 疥疮

注：a. 疥疮吸血部位和雌螨成虫简图；b. 患有艾滋病及严重疥疮（结痂疥疮）的双手（由 Wikimedia Commons，Adam Cuerden 提供，由作者发布在公共领域），见彩插

用涂有矿物油的解剖刀刮擦新形成的丘疹（未被抓伤），可以很容易对疥疮进行诊断。将削刮在油中的碎屑转移至载玻片，亮视野下放大 100 或 400 倍检查螨（300～400 μm）或更小的黑色粪便样颗粒。局部使用 5% 的扑灭司林软膏或 1% 扑灭司林洗剂（Nix，同样用于治疗头虱）可用于治疗疥螨。世界范围内，出于经济原因考虑，选用 12.5% 的苯甲酸苄酯用于治疗，但该药并未经美国 FDA 批准，因此在美国禁用。局部使用林丹（Kwell）同样有效，但 FDA 建议首先使用扑灭司林，仅仅在扑灭司林无效的情况下才使用林丹。林丹对儿童和青少年具有神经毒性。虽然最近研究证明口服伊维菌素更有效，但目前在正确使用的前提下，局部使用扑灭司林或苯甲酸苄酯仍然是首选治疗方法[24]。

毛囊蠕形螨，即毛囊螨，每个人都有可能感染。在面部、耳朵和胸部的毛囊中能够发现长为 500 μm 的螨（图 151-5）。由于用镊子拔除的睫毛根部可发现一些螨，引起了医生的注意，虽然它们大部分无致病性，但它们与几种皮肤疾病有关，包括酒渣鼻和毛囊糠疹。但是，人们认为这些联系是偶然的。相关的螨虫会在狗和牛身上引起蠕形螨病，但这些物种还没有感染人类。

粉尘螨过敏（是引起哮喘、鼻炎和过敏性皮炎的原因之一）是由吸入了粉尘螨排出的粪便引起的，或与人体共生、以人体皮屑为食的房尘螨相关。尘螨本身不会在人体寄生，但是它们可以留存在环境中（通常位于床垫或地毯中）并进行摄食和发育。每人每天可脱落 0.5 g 皮屑，一只雌螨每天可产 1 个虫卵，持续约 2 个月；因此，很容易形成大量的螨虫积聚。当患者出现一些非特异性损伤或一系列症状和体征时，就会描述看到 300～400 μm 长的螨虫，因为这些螨虫确实可在所有房屋里发现，在漂浮于水面的尘土中检测到；螨虫可

以漂浮，可以移动，可在放大 20 倍时看到。湿度低于 60% 会大大降低粉尘螨的密度，因此，应定期对被褥和地毯进行真空处理和清洗。一种舌下免疫疗法，旨在使患者对尘螨过敏原产生耐受，最近已获得 FDA 的批准，并可由过敏专科医生开出处方。

蝇蛆病是人或动物组织感染苍蝇幼虫寄生引起，即虫卵或一期幼虫沉积所致；幼虫食用周围组织进行发育，进入到三期幼虫后在环境中化成蛹。根据蝇的生活史模式，蝇蛆病分为 3 种：专性、兼性和偶发。专性蝇蛆病反映了幼虫在发育过程中需要有良好的食物供应，因为苍蝇成虫不进食或进食很少。肤蝇是专性蝇蛆病的主要例证。大部分肤蝇通常侵染动物，因此这些肤蝇引起的人肤蝇感染被认为是人兽共患病。其中两种苍蝇——人肤蝇和人皮蝇更适应人，这一点由它们的生活史证明。前一种苍蝇将卵产在转运（携播）宿主体内例如蚊虫，当蚊虫叮咬人时，这些虫卵在其吸血过程中孵化，幼虫在蚊虫叮咬部位穿透皮肤。后一种蝇被汗液、尿或粪便所吸引，在铺展地上或悬挂晾晒的衣物上产卵，在晾晒衣物的地方还有这种气味，当仍采用老（或简单）方法洗衣时，这种气味可能还残留。当虫卵接近人体时便开始孵化并钻进皮肤。因此，在热带国家清洗衣物时若没有皂粉和干燥剂，需在穿前对衣物进行熨烫。其他能引起人畜共患病的蝇类包括狂蝇属（绵羊的鼻蝇能引起眼蝇蛆病）、牛蝇属（疣蝇，引起皮肤蝇蛆病）和库氏菌病（疖或呼吸蝇蛆病）。

兼性蝇蛆病通常是由黑花蝇（*Phormia regina*）、丝光绿蝇（*Lucilia sericata*）和相关的丽蝇寄生导致，也会通过肉蝇（污蝇）或通过常见家蝇引起。通常这些苍蝇将它们的虫卵产于排泄物或其他腐烂的有机物中，有时直接将卵产在伤口或坏死组织中。然而，这些幼虫不会局限于这些组织中，它们会移动到其他健康组织。

“偶发蝇蛆病”是苍蝇幼虫偶然侵扰的结果，通常是家蝇，被发现于伤口敷料下方或在一些不常见的部位如胃肠道中。鼠尾状蛆（蜂蝇）通常是食蚜蝇，在污水和脏水中繁殖。幼虫生存于下消化道中[30]，尽管它们是如何进入的（可能是由于在排便过程中将虫卵产于肛门周围）还没有得到明确的证明。饮用未过滤的脏水可能引起暂时肠道感染，幼虫可以在小肠下段存活。通常，幼虫可见于用于存放临床试验的粪便样本的器皿中，很可能是由于样本采集后发生了产卵行为。节肢动物样本与临床体征和症状之间的关系几乎总是难以明确证明。

大量临床报告证明蝇蛆病发生与幼虫出现的部位有关。肤蝇可引起疖的病变，即游走性或皮肤蝇蛆病的迁移（可能出现于皮肤的一种匍行管道）。蝇蛆病伤口可能由浅的、袋状最后变为较深的伤口。蛆可能侵入鼻子及其附属器官，引起鼻或口腔蝇蛆病。蛆也可进入耳朵，引起耳蛆病。眼蝇蛆病是由于外部或内部感染引起的。小肠、阴道或膀胱蝇蛆病是由肠或外生殖器被侵袭引起的。在所有的病例报告中，病理改变是由组织或局部损坏引起的，但是更常见的是与继发细菌感染有关。另一方面，许多蛆并不促进细菌感染反而分泌溶菌素，类似于外科手术上进行清创[31]。事实上，无菌的绿蝇蛆虫在美国已作为一种处方药（www.monarchlabs.com）用于协助伤口清创。因此，蝇蛆病中继发细菌感染的情况提示蛆虫已经死亡。

在所有病例中，均通过清除蝇蛆进行治疗，用钳子尽力对其进行挑除。可引起疖性蝇蛆病或游走性皮肤蝇蛆病的蝇蛆，在损害部位可见它们的后端暴露出覆盖于呼吸组织的气门板。虽然对于如何清除蝇蛆有许多方法，包括用培根或猪油“引诱”法，最简单的方法是以矿脂（凡士林）覆盖于损伤部位，因此可以阻止蝇蛆呼吸（培根或猪皮可能是起到气门闭塞的作用，而不是蛆虫对肥肉偏爱）。蛆虫最终获得足够的空气移行出来，因此可以用钳子将其紧紧捏住。蝇蛆的鉴定是比较困难的。可通过气门进行鉴定（图 151-10），切下蝇蛆尾端的气门板，置于合适的包埋剂中并放在载玻片上，与图示进行比较。通常，活着的蛆虫可以在生肉上培养至化蛹，最后成为蝇成虫进行鉴定。另一方面，除了学术原因，大部分出现于发达国家的蝇蛆病案例均由旅游者携带导致，尚未明确苍蝇的种属对进一步的防控没有影响，现有治疗手段足以应对。对蝇蛆准确鉴定的一个重要原因是出于法医目的：各种专性或兼性蝇蛆病的发育速率可作为判定死者死亡时间的重要手段。美国法医昆虫学理事会（http://www.forensicentomologist.org）为从事这类工作的专家提供证书，并在需要准确鉴定时可向其成员进行咨询。

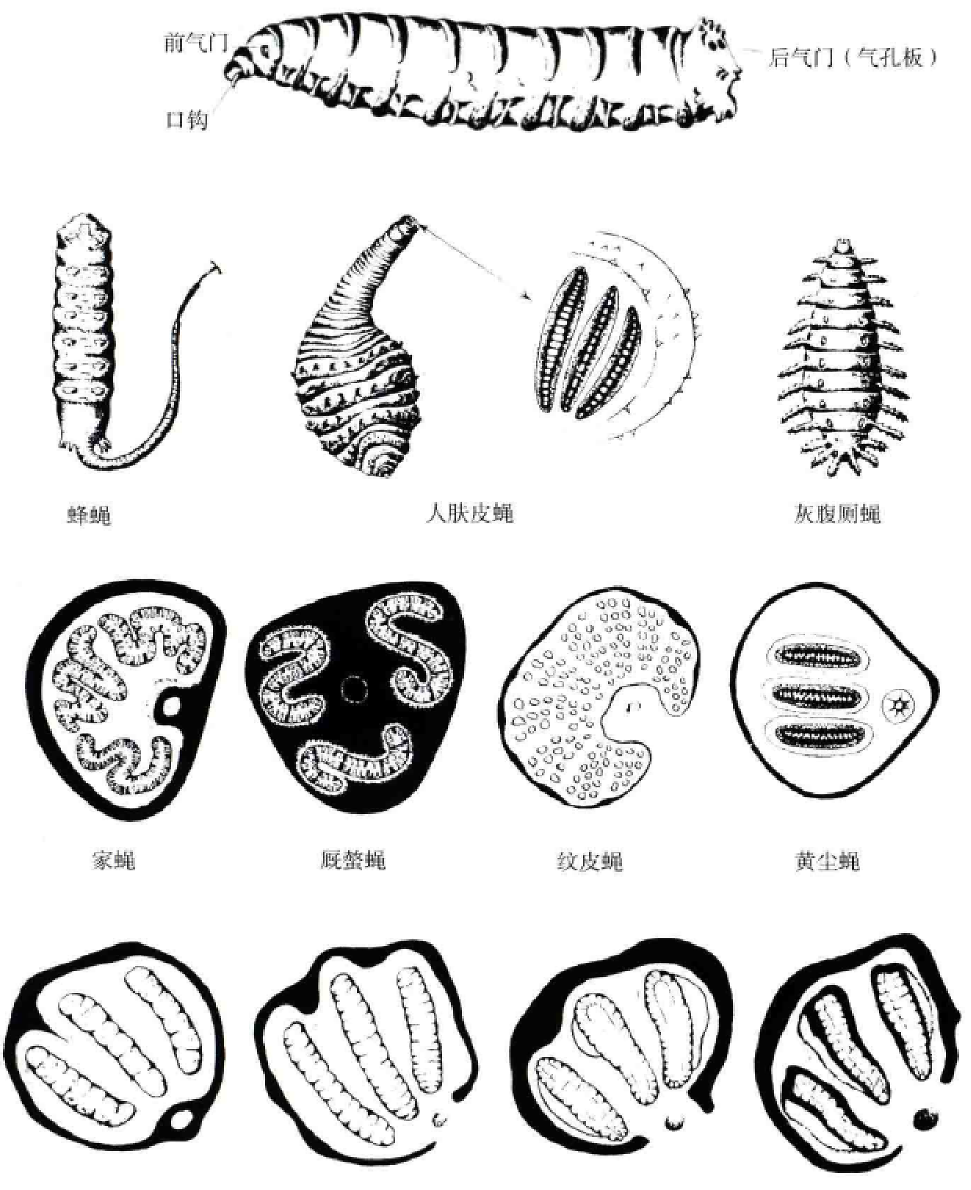


图 151-10　蝇蛆病，一些蝇蛆病产生苍蝇幼虫的主要特征

注：（第 1 行）蝇的成熟幼虫（来源：R. Hegner et al., Appleton Century Inc., New York, NY, 1938）。（第 2 行）蜂蝇幼虫，鼠尾蛆；人皮蝇，人肤蝇（具有扩大的气门）；厕蝇，灰腹厕蝇。（第 3 行和第 4 行）一些物种气门出现在后方，产生偶发、兼性或专性蝇蛆病（来源：GA，亚历山大疾病预防控制中心）

（三）螫刺和叮咬注入毒液（的节肢动物）

1. 膜翅目　黄蜂、蜜蜂和蚁类都属于膜翅目，已鉴定的虫种超过 100 000 种。膜翅目是中小型昆虫，具有复眼、下颚和两对透明的翅（尽管蚁类翅仅在雄性或雌性蚁一年中的某些时段可见），经历从幼虫至蛹的完全变态。临床重要性主要集中于针尾亚目，尤其是胡蜂（群居和独居的黄蜂）、蜜蜂（群居和独居的蜜蜂）和蚁总科（蚁类）。大部分针尾亚目在第一腹节和第二腹节之间具有一个典型的收缩特征。这些昆虫具有复杂的社会学行为，分为雄虫、雌虫和工种。工人具有叮刺器官，用于保卫领地或俘获猎物。

大部分膜翅目叮刺宿主会引起局部反应，有时会伴有极端疼痛，导致暂时的充血和硬结。由于它们生存于大规模群体当中，蜂类和蚁类对入侵者可能会蜂拥而上，并且持续进行叮刺。多次叮刺面部或颈部会导致气道阻塞。尽管蜜蜂对植物传粉具有重要的农业价值远远超出了因它们叮咬造成的轻微损伤，最初非洲蜜蜂（*Apis mellif-*

era adansonii，常见蜜蜂的一个亚种；又称"杀人蜂"）被引入巴西的目的是希望它们能够更好地帮助授粉，但是它们与典型的蜜蜂相比具有更强的攻击性，从而比较危险。蜜蜂与黄蜂、蚁类的不同在于它们在叮刺过程中会用力地扯下叮刺器官，最终导致死亡。黄蜂和蚁类可以反复叮咬数次；一些火蚁可以通过它们的下颚紧抓猎物并反复刺入毒刺。

蜂毒通过鉴定，由大量多肽（蜂毒素类）、磷脂酶 A_2、组胺、透明质酸酶、肥大细胞释放的肽类和蜂毒明肽组成。组胺似乎是蜂刺引起急性疼痛的原因。

熊蜂、胡蜂、鲜黄色胡蜂和黄蜂均会对闯入蜂巢过近的外物进行叮咬。被蜜蜂或黄蜂叮咬最重要的临床表现是过敏反应。首次被叮咬的人可能会出现胸闷、恶心、眩晕、发绀和荨麻疹等症状。每年在美国都会有几十人因蜜蜂叮咬引发过敏反应而死亡。

另一方面，蚁类通常不会引起过敏反应，但其造成的反应可能会持续更长的时间。蚁类叮咬后可能立刻出现硬结或风团，瘙痒或刺激持续几天后发展为丘疹。随后可能继发细菌感染。火蚁（红火蚁）具有叮咬或螫刺行为，两种方式都伴有毒液注射，前者含乙酮，后者含多种 2,6-二氧代吡啶。其他蚁类的毒液主要是蚁酸。

2. 螫毛虫 鳞翅目（蛾和蝴蝶）经历完全变态发育，具有众所周知的幼虫和茧阶段。这个家族超过 100 000 种。虽然一些成蛾（在 4 个超家族中）可能吸食血液或泪液，但并未表现出与吸血相应的进化特征。然而，鳞翅目中至少有 8 个科，是具有螫毛的毛毛虫，其中一些新热带区的物种可以导致严重反应，包括出血性综合征（一种亚马逊天蚕蛾），由毒刺中渗出的溶纤维蛋白毒素造成。即使在最发达的国家，毛虫相关疾病也很可能没有得到充分的认识和报道。更典型的症状是与其体毛接触后产生的皮疹或芥酸疹。褐尾蛾（棕尾毒蛾），一种欧洲和北美洲东北部常见的树木害虫，当其幼虫蜕皮时，会释放小小的具有倒刺的体毛。新英格兰各州引入的吉普赛蛾（*Lymantria dispar*）的大规模周期性入侵活动最近导致皮肤科的就诊人次增加。这些体毛随风播散，当与暴露皮肤接触时，会产生严重的皮炎；刺毛引起的皮炎包括瘙痒、大量红斑并伴有小囊泡和水肿等症状。长时间的接触（如当碎屑中含有毛发或毛虫的皮毛污染衣服下汗湿的皮肤时）可能导致溃疡、焦痂形成及留下瘢痕（图 151-11）。使用包裹绒布条的吸尘滚轴可非常有效地移除所有刺毛。户外活动后及时淋浴可以大大减少其体毛长时间接触的可能性。



图 151-11 毛虫荨麻疹：暴露于棕尾毒蛾毛 2 个月后的慢性瘢痕（马萨诸塞州，2017 年），见彩插

与毛毛虫接触后可观察到另外 4 种综合征[32]。鳞翅目、树突状纤毛症、结节性眼炎和纤维蛋白溶解性凝血病较不常见，但可能未被充分认识。鳞翅目昆虫病是一种全身性疾病，当与带有体毛的气体接触时，会出现全身性的体征和症状，如头痛、全身皮疹、咽炎和呼吸窘迫，也可能导致结膜炎。树突毛病是与亚洲松树树蛾（*Dendrolimus pini*）有关的鳞翅目寄生虫病。暴露于蛾茧或毛虫的体液似乎会引发过敏反应和慢性关节病。结节性眼炎是由螫毛虫毛（也包括狼蛛体毛）穿透角膜引起的慢性葡萄膜炎。最后，南美的落叶松毛虫可以通过其刺状的"毛发"分泌一种含有蛋白酶和凝血剂的毒液。这些棘突的尖端穿透皮肤可导致立即出血和瘀点，发展为明显的出血性疾病，最终可导致急性肾衰竭或颅内出血。治疗包括恢复凝血因子和服用抗纤溶药。在巴西，一种实验性的抗蛇毒血清正在进行测试，那里有一种关于落叶草凝血病日益流行的趋势已被记录在案。

3. 蝎 蝎是具有典型蟹状外观的蛛形纲虫体。躯干由头胸部和分段的腹节及尾组成，尾部末端具有突出的叮刺器官（螯刺）。有四对足，其

中第一对为钳。体型大小是 2～10 cm。蝎经历不完全发育(未成熟阶段类似小型成虫),已知大约有 1000 种,其中可引起疾病的少于 50 种。蝎主要存在于温和气候地区。尾部的球状物含有肌肉可以迫使毒液从叮刺射出。所有蝎类都可以捕食其他节肢动物,使用它们的毒液将捕食对象固定。在夜间赤脚行走、在流行地区的早晨没有抖动鞋子、掀起石头或圆木或者直接睡在地上的人们都可能会遭遇蝎类的叮咬。这种叮咬会引起局部疼痛(可能是由于毒液中含大量的生物胺)、水肿、变色和感觉减退。全身性体征包括休克、流涎、意识模糊或焦虑、恶心、心动过速和抽搐。根据蝎的种属不同它们的毒液存在差异:一些可刺激副交感神经并诱发儿茶酚胺类最终刺激交感神经,导致呼吸衰竭[33]。其他影响中枢神经系统的症状是溶血或者引起局部坏死。遭受多次叮刺的人可能会出现超敏和过敏反应。

尽管在一些地区存在具有危险性的种类,例如:中东(金蝎属、荧光蝎属、钳蝎属)、南部非洲(黑粗尾蝎属、钳蝎属、幽灵荧光蝎属)、南美洲和中美洲(蛛蝎属)和美国南部(刺尾蝎属),但对患者进行通常的对症治疗,快速使用压力绷带包裹住叮咬部位并固定住四肢(如果是叮咬部位的话),这将有助于防止毒素通过淋巴管进行扩散。在叮咬部位直接注射利多卡因可减轻疼痛。尽快寻求医学手段,正确及时给予抗毒素治疗可以降低死亡率。然而,抗毒素通常是种特异的,如果没有带来蝎种进行鉴定,使用抗毒素将无从下手。

4. 蜈蚣和马陆 蜈蚣(唇足亚纲,2800 种)和马陆(倍足亚纲,8000 种)为长形、蠕虫状的节肢动物,具有数十节,每节有一对足。二者都是不完全变态发育,幼虫形态与成虫相似。“蜈蚣”一词表明其具有 100 节(成对的足)或更少一些,“马陆”一词意味着超过 100 甚至高达 1000 节,这种简述并不十分正确,但通常来说,足多的为马陆,较少的(但是超过昆虫或蜱)则认为是蜈蚣。其他差异非常明显:马陆的横截面为圆形,但是蜈蚣的背腹部是扁平的;马陆口器位于腹部且不锋利,然而蜈蚣口器向前突出而且锋利。马陆移动速度较慢,反映了它们在碎石上进食的生活方式,蜈蚣相对其他节肢动物而言是快速捕食者。

马陆和蜈蚣在热带地区都具有极大的物种多样性,事实上,关于它们的所有医学重要性都是在气候温和地区发现的。马陆会由体节的孔中喷出有毒的腐蚀性液体。这些液体可能包含苯醌、醛类和氢氰酸,引起灼烧感,然后出现红斑和水肿,甚至进展为起水疱[34]。大多数马陆还具有令人厌恶的气味;腐蚀性液体和气味用于保护它们避免被捕食。当人们踩到或激怒马陆时可能会沾染这些液体(逗弄马陆的儿童往往是受害者)。治疗方案包括尽快清洗刺激部位从而稀释或移除腐蚀性液体,并且对皮肤损伤和疼痛进行对症治疗。马陆还可以作为一种人畜共患的棘球蚴的中间宿主。蜈蚣具有强有力的下颚,下颚之间由第一对足衍生出可以注射毒液的尖牙样结构(颚肢)。这种毒液用于固定猎物同时也用于防御。当人们踩到、躺在其上或逗弄蜈蚣时会遭到其叮咬。毒液导致局部疼痛和肿胀并伴有近端淋巴结病变,通常表现为头痛、恶心。皮肤病灶可能会溃烂并坏死。蜈蚣咬伤出现的死亡仅有 1 例确诊:一名菲律宾儿童被一只大蜈蚣咬伤头部。美国东部的蚰蜒(*Scutigera coleoptrata*)是住宅常见的蜈蚣,常见于浴缸中。这种多体毛、小个子(长 5～8 cm)的蜈蚣事实上是有益动物,可在室内捕食蟑螂和其他可能的害虫。然而,其强大的下颚可造成被咬者疼痛,它毒性温和,产生的叮咬效果类似于蜜蜂的叮刺。

5. 蜘蛛 蛛形目中大约有 30 000 种,但它们当中仅有一小部分具有医学意义。大部分体型非常小(0.5 cm 或更小),但有一小部分与人的手掌大小差不多。已知有 2 个主要的亚目:猛蛛亚目,具有镶有尖牙的螯肢,可以上下摆动;新蛛亚目,螯肢类似于昆虫的下颚,可以左右运动。蜘蛛的头胸部不分节,有一个腹部、4 对足、突出的螯肢和特化的可以分泌织网丝的吐丝器。所有蜘蛛均可捕食其他节肢动物,通过使用它们的毒液将活的猎物固定住。在进食前数小时,蜘蛛使用它们的螯肢将猎物撕裂并以消化液浸润猎物。因此,尽管所有蜘蛛都有强壮的用于撕咬的螯肢,都有可以固定猎物的毒液,但大部分蜘蛛体型非常小,以致即使它们叮咬人类,也难以引起注意。医学上蜘蛛主要分为 4 群[35-36]:澳大利亚的漏斗网蛛或蝰蟷(*Atrax* spp.,*Hydronyche* spp.),新大陆和南非隐斜蛛(斜蛛属),南美漫游蜘蛛(毒蛛属)。其中隐士蜘蛛和黑寡妇蜘蛛已通过人类广泛传播。

4种主要蜘蛛毒性的临床表现和并发症不同，每种蜘蛛引起的体征都有特定的名称，这样就可以反映出蜘蛛的种类。通常，蜘蛛咬伤会产生局部疼痛，在叮咬处出现红斑，同时伴有发热、寒战、恶心和关节疼痛。被棕花蛛咬伤时，咬伤部位会发生溃烂至坏死，皮肤脱落，周围组织也会遭到破坏，接着出现溶血、血小板减少和肾衰竭。对于毒蛛、罗纳栉蛛和漏斗网蛛，其毒液均具有很强的神经毒性。肌肉强直和痉挛（类似于急性腹痛）可见于毒蛛中毒，并发症包括心电图（EKG）异常和低血压。罗纳栉蛛毒可导致视觉障碍、眩晕和虚脱，并发症包括低血压和呼吸麻痹。漏斗网蜘蛛会引发自主神经系统兴奋，伴有肌肉颤搐、流涎症、流泪、恶心和上吐下泻，呼吸暂停或喉痉挛可能会引起致命性的呼吸停止[37]。

被漏斗网蜘蛛咬伤需要急救，毒蛛中毒和罗纳栉蛛毒也同样需要急救。使用压力绷带包裹咬伤部位，如果肢体被咬伤，则需用压力绷带和夹板将患肢固定住（与蛇咬伤的标准程序相同）。这样能够防止毒液从局部淋巴管扩散。患者应尽快寻求抗毒血清的治疗。另外，应使用镇痛和解热药进行对症治疗。

狼蛛是非常受欢迎的宠物，样子比较可怕。庆幸的是，它们温顺，其导致的大部分损伤是由它们的螯毛引起的，尤其是结膜炎。然而，因其具有强大的下颚和毒液，故不应对其进行挑衅。它们的咬伤程度类似于蜜蜂叮刺。

皮肤坏死病变通常由棕花蛛咬伤所致，一些地区中可能存在未知的种类：在诊断的216例"棕色隐士蛛咬伤患者"中仅有35例具有极少证据支持这种病因，也就是，已知棕色隐士蛛会在这些地理区域出现[38]。事实上，在美国东部，一些表皮坏死实际是由黄囊蜘蛛引起，它属于毒蜘蛛属，相关的红螯蛛属会引起疼痛的焦痂并持续数周。然而，一篇综述文献并不能确定这些蜘蛛是病因[39]。蜱叮咬引起的严重反应或莱姆病的游走性红斑会与隐士蜘蛛和其他种类的蜘蛛咬伤症状相混淆[40]。

（四）节肢动物引起的各种损伤

昆虫中有40%是由甲虫（鞘翅目）组成，即使种类如此繁多，但是它们中极少数是有害的。大部分损伤与分泌物中含有的斑蝥素引起的水疱有关。存在血淋巴（血）的一些甲虫，通常叫作斑蝥，也含有这种刺激物，因此与活的或死的（压碎的）甲虫直接接触会沾染这些物质。斑蝥素是斑蝥的活性成分，斑蝥粉据称有壮阳的作用。摄入斑蝥会刺激输尿管和尿道，引起疼痛性阴茎异常勃起。过量或长期服用者会引起肾小管坏死。这可能是斑蝥不再作为一氧化氮抑制剂的原因。

罕见的步甲科，投弹手甲虫，喷射沸腾（100℃）的苯醌作为其防御物[41]，可引起烧伤和起疱。因含有毒性生物碱成分隐翅虫素，压碎东南亚褐毒隐翅虫属隐翅虫时也可以引起水疱。

更为常见的是，毛毯甲虫（皮蠹），以羊毛毯和其他动物皮毛用品为食，与丘疹水疱性暴发有关。尤其是皮蠹幼虫和它们的体毛或蜕下的皮（蜕皮）能够引起接触性皮炎。

龙虱（实际上是半翅目成员），又称水龟子，人在毫不知情的情况下涉水，它会狠狠夹住其脚趾。

四、其他损伤

寄生虫引起的妄想或幻觉 寄生虫幻想是由于患者出现瘙痒，但误认为是由不相关的节肢动物侵扰导致的。通常，这种瘙痒是由于药物反应、晒伤、去垢剂、刺激性粉尘、毒藤或是真正的节肢动物叮咬（包括许多其他可能的瘙痒来源）引起的，可持续数月。一旦患者得到帮助，鉴定了实际的瘙痒原因，他们将不再会纠结于节肢动物。相反，在妄想性寄生虫病[又称埃克波姆（Ekbom）综合征]中，不适的源头可能不是节肢动物引起的，但患者并不接受这一说法。在一些患者中，无明显的病变，但患者坚称他们被感染了。很多这样的案例都是受过高等教育的人，他们能够非常详细地描述他们的受侵扰情况。然而，他们并不能提供样本，或他们提供的往往不是完整的，只是节肢动物的一部分。妄想性寄生虫病可能是一种严重的疾病，可以由经验丰富的心理健康专家进行治疗。

五、鉴定送检样本

对于大多数研究，在物种水平进行鉴定（"这是阿氏真恙螨"）与进行更高一级的分类学识别（"这

是恙螨")相比，可能并不能提供更多的临床相关信息。在一些案例中，简单描述"这的确是节肢动物的一部分，可能是甲虫"就足以满足治疗所需（在这个例子中，甲虫可能暗示存在短膜壳绦虫感染或是由肉食甲虫幼虫引起的荨麻疹或是由投弹手甲虫灼热的喷雾引起的水疱）。一只完整的节肢动物可在一个种群中与结构图进行比较。由CDC公布的经典图片（来自http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/CDProducts.htm）或使用简单的二叉式检索表可用于将鉴定范围缩小至已知医学重要节肢动物的种属（表151-3，表151-4）[42-43]。其他更具体的信息通常需要参考分类学资料或向昆虫学家寻求帮助。农业推广服务机构、大学昆虫学系、当地蚊虫或害虫防治组织、寄生虫学家或当地臭虫收集爱好者俱乐部均有助于样本鉴定，并且往往出于专业精神而不收取费用。[值得注意的是这样的机构很少是经临床实验室改进法案（CLIA）认证的，因此收取服务费是不合理的。]

表151-3 医学上重要的节肢动物主要类群的特征总结[a]

分组	身体部分	腿部	触角	翅膀	举例
六足纲（昆虫）	成虫，3（头部，胸部，腹部）；幼虫通常没有明确的区域划分	成虫和一些幼虫3对；幼虫也可能含有前腿	通常在成虫中出现，1对	成人中通常存在1～2对	蚊子，虱子，跳蚤，黑蛉，吻锥蝽，臭虫，蜜蜂，黄蜂，蚂蚁
蛛形纲	通常2个（头胸部和腹部）	成虫4对（螨，蜱虫幼虫3对）	通常无	通常无	蜱（itch和follicle）螨，恙虫，毒蜘蛛和蝎子
甲壳纲（甲壳虫）	可变，1～2	成虫可变，通常为5～7对	通常存在，2对	通常无	舌形虫（舌形虫）
唇足纲（蜈蚣）	2，头与身体	每1节身体部分15对	目前，1对	通常无	少数有毒物种
双翅目（千足虫）	2，头部和身体	每2节身体部分40对	目前，1对	通常无	一些产有毒分泌物的物种

注：[a]经允许复制自参考文献[43]

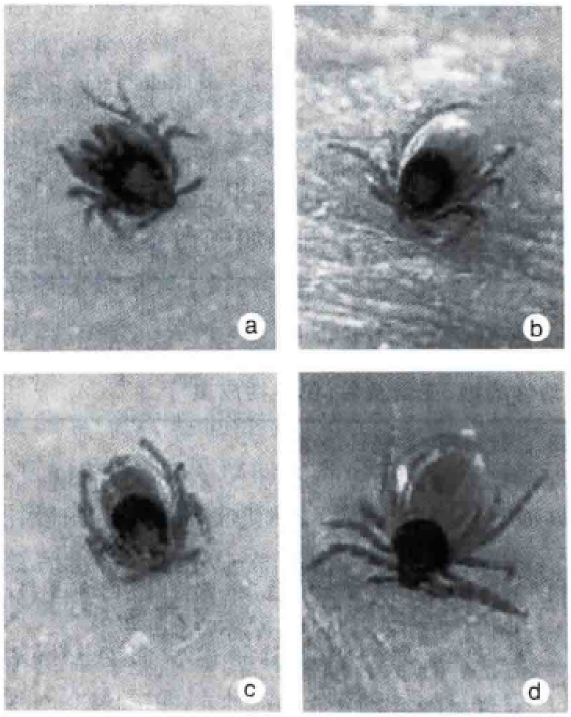
表151-4 常见具有医学价值的节肢动物的纲、亚纲及目（仅包括成虫[a]）

1	3或4对足[2]
	5或更多对足[22]
2	3对足，有触角（昆虫纲：昆虫目）[3]
	4对足，无触角（蛛型纲：蜘蛛、蜱、螨、蝎）[20]
3	具发达的翅[4]
	无翅，或翅不发达[12]
4	对翅（双翅目：苍蝇、蚊、蠓）[5]
	2对翅[6]
5	翅具鳞片（双翅目：蚊）
	翅无鳞（双翅目：其他蝇类）
6	具刺吸式口器，具长喙[7]
	具咀嚼式口器，无长喙[8]
7	翅密覆鳞片，喙卷曲（鳞翅目：蝴蝶和蛾子）
	翅无鳞，喙非卷曲而向后（半翅目：臭虫和吻锥蝽）
8	两对翅膜质，结构相似，但可大小不一[9]
	前翅革质或壳状，覆盖并保护后翅[10]
9	两对翅大小类似（等翅目：白蚁）
	后翅显著小于前翅（膜翅目：黄蜂、马蜂和蜜蜂）
10	前翅角质或革质，无显著翅脉，在中间交汇[11]
	前翅皮质或纸质，有显著翅脉，通常在中部叠加（网翅目：蟑螂）
11	腹具显著的尾突或钳，翅较腹部短（革翅目：蠼螋）
	腹不具显著的尾突或钳，翅可覆盖腹部（鞘翅目：甲虫）
12	腹端具3根长尾（缨尾目：蠹虫和蠹鱼）
	腹端无3根长尾[13]
13	腰腹部窄（膜翅目：蚂蚁）
	腰腹部不窄[14]
14	腹部具非常显著的尾突或钳（革翅目：蠼螋）
	腹部无尾突或钳[15]
15	身体侧面扁平，触角小，适合头部侧面的凹槽（蚤目：蚤）；
	身体背腹扁平，触角伸出头，不符合凹槽[16]
16	触角9节或大于9节[17]
	触角3～5节[18]
17	前胸背板覆盖头部（网翅目：蟑螂）
	前胸背板不覆盖头部（等翅目：白蚁）
18	口器由管状喙组成，3～5节（半翅目：臭虫）
	口器收缩进头部，或为咀嚼式口器，1～2节[19]
19	口器收缩进头部，适合吸血（虱目：吸血虱）
	口器适合咀嚼（食毛目：嚼虱）
20	身体椭圆形，躯体不分节（蜱螨亚纲：蜱和螨）
	躯体分为2个显著分节，即头胸部和腹部[21]
21	腹部通过细腰同头胸部连接，腹部分节不明显或不分节，无刺（蜘蛛目：蜘蛛）
	腹部直接同头胸部连接，腹部明显分节，尾部有刺（蝎亚纲：蝎）
22	5～9对足或具游泳足，1或2对触角，营水生（甲壳纲：甲壳类，小龙虾和蟹）
	超过10对足，或不具游泳足，1对触角，营陆生[23]
23	每个体节仅具1对足（唇足纲：蜈蚣）
	每个体节具2对足（倍足纲：马陆）

注：[a]数据来源于参考文献[49]和[50]

在一些案例中，患者可能坚持要求对节肢动物样本进行检测，从而证实节肢动物是传染源。这种案例更常见于莱姆病地方性流行的地区。一些商业实验室使用 PCR 检测莱姆病螺旋体的存在，证实在传播媒介中的感染率是 15%～70%，这是一个正面的结果。一些实验室现在提供全套 PCR 检测，包括所有的鹿蜱微生物协会[44]（田鼠巴贝虫、宫本疏螺旋体、嗜吞噬细胞无形体和鹿蜱病毒）。这种做法除了满足患者的心理需求，其存在价值是值得怀疑的。当一个健康的患者面对这样的测试结果时，医生们常常困惑于如何处理这些信息；大多数人不会根据蜱虫感染的发现开出治疗处方。对莱姆病来说，可以以 1 或 2 剂 100 mg 多西环素预防用药，前瞻性随机安慰剂对照临床研究表明，这种方法可将被蜱虫叮咬后的感染风险降低 85%。少数流行病学研究表明，大约 70% 的莱姆病或落基山斑疹热患者从未回忆起急性疾病之前的蜱虫叮咬[15-16]，因此，发现被咬并提交蜱虫的通常是一个健康的人。

对于明确蜱虫叮咬风险最重要的问题是确定叮咬时间（图 151-12*）。如果鹿蜱叮咬未超过 24 h，除了莱姆病螺旋体、田鼠巴贝虫或粒细胞埃里希体病因子，其他感染的可能性非常小。这种“宽限期”的生物学基础是一种名为“重激活”的现象。在蜱虫两次血餐之间病原体会进入休眠期，之后需要一个复制周期[45]。



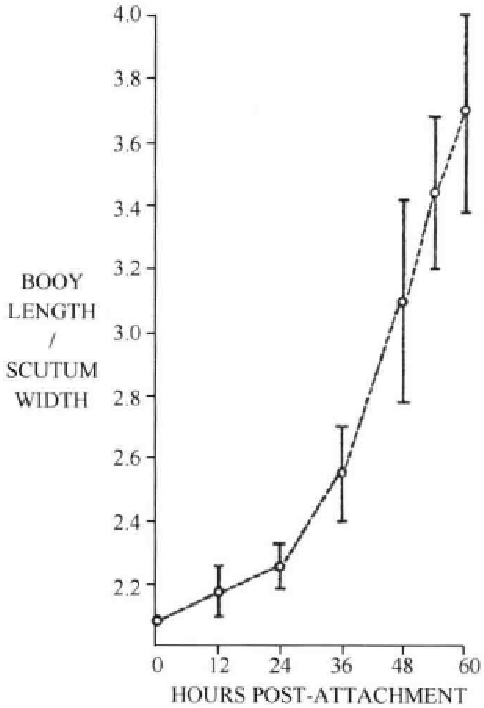


图 151-12 Gradual engorgement of feeding ixodid ticks. (Left panel) Four-day feeding sequence of nymphal Ixodes ricinus (reprinted from Matuschka FR, Spielman A, Lancet 342:529, 1993, with permission from Elsevier). (Right panel) Scutal index of engorgement for Ixodes dammini (from reference 45, reprinted with permission of the American Society of Tropical Medicine and Hygiene).

重激活现象首次用于描述落基山斑疹热病原体，其在接触宿主后 12～18 h 唾液腺才具有传染性。在大部分硬蜱传播的病原体中重激活可能是一种常见现象，唯一已知的例外是病毒引起的蜱传脑炎和相关的波瓦生热（Powassan fever），被认为传播和吸附同时进行。

与评估感染存在与否相比，对蜱虫充血膨胀程度进行评估可能能提供更多的个人风险指数。对鹿蜱可进行简单测量，其他种类的蜱也可以尝试同样的操作。盾板指数（图 151-12）是指蜱自口器顶端至尾部边缘的长度/盾板宽度，盾板是蜱背部的防护罩。盾板指数＞2.5 表明鹿蜱吸附超过

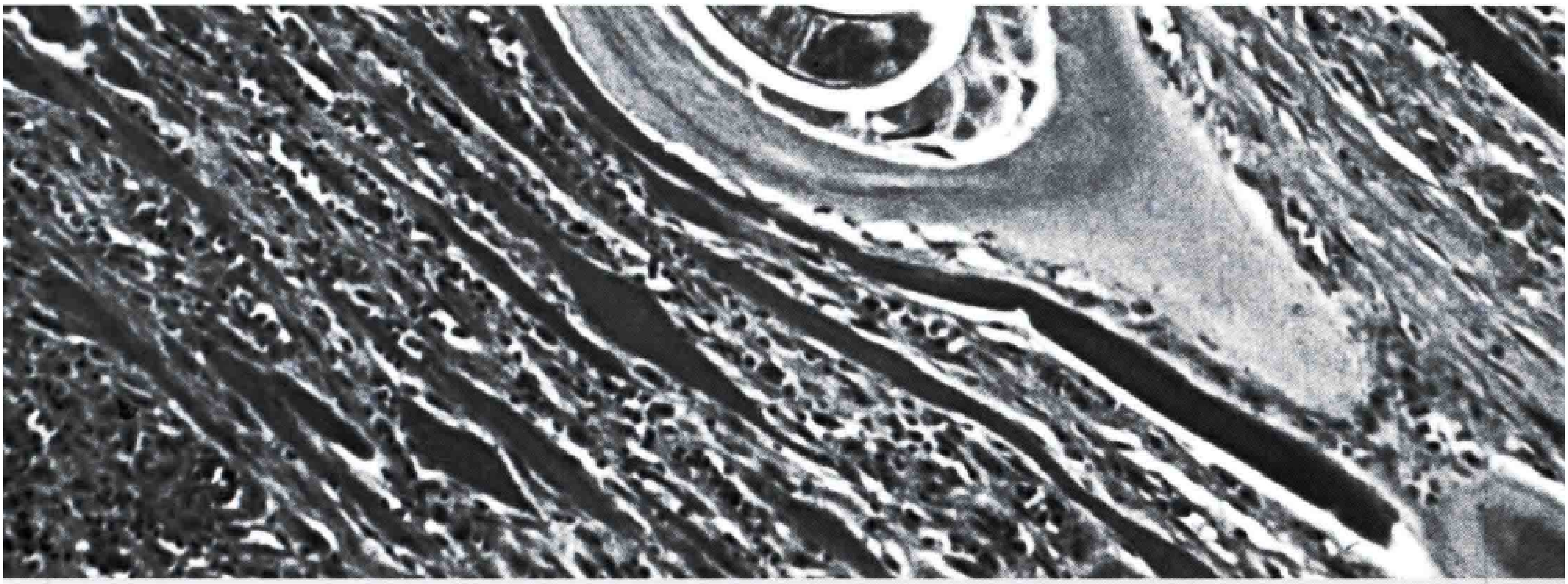
*译者注：原著引用其他著作图，未经原作者授权翻译，故此保留原图

24 h,因此可能已经发生了病原传播[45],出现这种结果应及时就医,使用预防性抗生素能够有效中断莱姆病或 HGE。虽然这种预防可能无法预防巴贝虫病,但值得注意的是巴贝虫通过鹿蜱传播需要的吸附时间最长,这可能与其在吸附过程中需要进行孢子生殖有关。

通过 DNA 序列鉴别物种的通用条形码系统取得了显著进展。尤其是在线粒体细胞色素 C 氧化酶亚型 I(COI)的 5′端,648 个碱基对可作为 PCR 靶点,从扩增产物中获得的核苷酸序列可与一个大型在线数据库进行对比(BOLD[46], http://ibol.org/)。大部分动物物种在它们的 COI 基因中包含唯一的序列,因此可与其他相关物种进行区别。在 BOLD 数据库中共有近 750 000 个序列。包括节肢动物门全部 16 个纲的序列及昆虫纲全部 30 个目。因此,事实上所有节肢动物样本通过提取其 DNA、扩增 COI 基因序列,然后以 FASTA 形式在 BOLD 服务器提交数据,从而实现目甚至是科或属水平的鉴定。假设设备可以满足需求(热循环仪、凝胶电泳、移液器和其他生物学实验室常见材料),一次鉴定可能需要花费 150～200 美元(5 个人工时、PCR 试剂、300 个碱基对测序所需的商业费用),并需几天时间(通常,自提交 DNA 样本到获得 DNA 序列图谱至少需要 24～48 h)。一项简单的 DNA 提取技术("HotSHOT",使用热氢氧化钠和 Tris 中和反应)可用于大部分样本制备,进而进行 PCR 检测[47]。扩增 COI 基因信息片段所需的条件和 PCR 引物可以由保藏标本馆公布的分析数据中获得,与许多法医样本或临床样本[48]类似,其中包含已降解的 DNA。编码识别技术的优势在于此方法不存在主观性,不需要经验丰富的专家进行形态学鉴定;具有基本专业知识的分子生物学人员就可以完成。然而,经典方法不仅仅需要显微镜,除去费用还需要专业精神。一些商业网站(例如 www.identifyus.com)提供实时虚拟形态学鉴定,委托方可以上传节肢动物图像,专家对其进行快速鉴定。此外,业余昆虫学家网站(例如,www.bugguide.net)在样本鉴定中也能够提供极大的帮助。"Dr. Google Image"对于怀疑有节肢动物起源的病理学是非常有用的[例如,查询"昆虫接触后的皮肤水疱灼伤"会产生"水疱甲虫伤痕"或一份被提交标本("来自床上的扁甲虫"会展示臭虫的图片)]。

参考文献请扫二维码查阅

第九部分　抗寄生虫药物和敏感性试验方法



第九部分　抗寄生虫药物和敏感性试验方法

第152章　抗寄生虫药物

KARIN LEDER, SARAH L. MCGUINNESS, PETER F. WELLER

（郭大文　译；苏建荣、陈家旭　审校）

目前市面上存在多种有效的抗原虫（antiprotozoal）和抗蠕虫（anthelminthic）药物[译者注：原文为驱虫药（anthelmintic），根据上下文，译者认为应该是抗蠕虫（anthelminthic）]。抗寄生虫药物（antiparasitic agents）在治疗个体感染和控制群体寄生虫感染方面都非常重要。大规模药物治疗可以降低淋巴丝虫病、盘尾丝虫病、血吸虫病和肠道线虫感染的传播、发病率和死亡率。然而，缺乏开发新药物的财政补贴是未来抗寄生虫化疗的一个主要限制因素。由于抗寄生虫药物耐药性的出现、缺乏有效的抗寄生虫疫苗和全世界范围内巨大的疾病负担，对寄生虫感染的有效管控仍面临挑战。

本章主要阐述一线抗寄生虫药物和抗寄生虫新药的作用机制、药理学（pharmacology）、临床应用和不良反应（adverse effects）等。人体大多数蠕虫感染可以使用以下5种药物之一进行治疗，即阿苯达唑（albendazole）、甲苯达唑（mebendazole）、吡喹酮（praziquantel）、伊维菌素（ivermectin）和乙胺嗪（diethylcarbamazine，DEC），所以针对这5种药物将进行详细叙述。另外，硝唑尼特（nitazoxanide）同时具有抗蠕虫[译者注：原文为驱虫药（anthelmintic）]和抗原虫作用，也将作进一步讨论。其他主要的抗原虫药物，包括用于疟疾（malaria）、胃肠道原虫感染、利什曼病（leishmaniasis）和锥虫病（trypanosomiasis）的药物也将进行阐述，但无法囊括所有药物。具体来说，我们排除了非一线用药或只在特殊情况下应用的药物，如在儿童中使用的呋喃唑酮将不包括在本书内容中。三苯双脒是一种新型的治疗肝吸虫（华支睾吸虫和后睾吸虫病）的药物，但疗效仍在试验中且未获得批准应用，所以本文未涉及。另外，一些抗细菌药物和抗真菌药物也可用于治疗原虫感染，如5-硝基咪唑、复方磺胺甲噁唑、阿奇霉素和两性霉素，也不做详细讨论，它们在抗寄生虫感染的主要适应证见表152-1和表152-2。抗寄生虫药物的耐药性和药敏试验在其他章节阐述。

表152-1　肠道、血液、组织（非疟原虫）和泌尿生殖道原虫感染的治疗方案[a]

微生物或疾病	首选药物	其他药物
肠道原虫		
溶组织内阿米巴	侵入滋养体：甲硝唑	替硝唑
	细胞内药物：双碘喹啉	其他细胞内药物：安特酰胺糠酸酯、巴龙霉素
	四环素	甲硝唑，双碘喹啉
结肠小袋纤毛虫	硝唑尼特	
微小隐孢子虫	人类免疫缺陷病毒/艾滋病患者：抗逆转录病毒疗法恢复免疫力	硝唑尼特[b]
卡氏环孢子虫	复方磺胺甲噁唑	
贝利囊孢子虫	甲硝唑	双碘喹啉，巴龙霉素
脆弱双核阿米巴	甲硝唑	替硝唑，硝唑尼特，奎纳克林，阿苯达唑，呋喃唑酮，巴龙霉素
十二指肠贾第鞭毛虫	替硝唑	甲硝唑，硝唑尼特，阿苯达唑，巴龙霉素，呋喃唑酮，奎纳克林

（续 表）

微生物或疾病	首选药物	其他药物
血液和组织原虫		
阿米巴性脑膜脑炎	两性霉素 B	各种组合的属米替福新，克林霉素加奎宁
巴贝虫属原虫	阿托伐醌加阿奇霉素	米替福新，喷他脒，巴龙霉素
利什曼原虫——内脏利什曼病[c]	两性霉素 B 脂质体	米替福新，五价锑，两性霉素 B，喷他脒
利什曼原虫——皮肤或黏膜利什曼病[c]	无治疗选择；应个体化治疗	
刚地弓形虫	乙胺嘧啶加磺胺嘧啶	
布氏锥虫（非洲锥虫病）	早期：苏拉明（罗得西亚布氏锥虫）或喷他脒（冈比亚布氏锥虫）	
	晚期：硫胂密胺（罗得西亚布氏锥虫）或依氟鸟氨酸加硝呋莫司（冈比亚布氏锥虫）	苄硝唑
克氏锥虫（美洲锥虫病）	硝呋莫司	苄硝唑
泌尿生殖道原虫		
阴道毛滴虫	甲硝唑	替硝唑

注：[a] 改编自参考文献[1]；[b] 参照表 152-8；[c] 改编自参考文献[167]

表 152-2 主要蠕虫感染的治疗方案[a]

微生物或疾病[b]	首选药物	其他药物
线虫		
犬钩口线虫（嗜酸性小肠结肠炎）	阿苯达唑	甲苯达唑
广州管圆线虫	支持性疗法	阿苯达唑加类固醇
蛔虫	阿苯达唑	甲苯达唑，伊维菌素
毛细线虫	甲苯达唑	阿苯达唑
皮肤幼虫移行症	阿苯达唑	伊维菌素
蛲虫	阿苯达唑	甲苯达唑
丝虫病（斑氏丝虫、马来丝虫）	乙胺嗪加或不加阿苯达唑或伊维菌素	
颚口线虫	阿苯达唑	伊维菌素，手术切除
钩虫	阿苯达唑	甲苯达唑
罗阿丝虫（仅治疗浓度不高的微丝蚴血症）	乙胺嗪加或不加阿苯达唑或伊维菌素	
盘尾丝虫	伊维菌素	
粪类圆线虫	伊维菌素	阿苯达唑
弓首蛔虫（内脏幼虫移行症）	阿苯达唑	甲苯达唑
旋毛形线虫	阿苯达唑加类固醇	甲苯达唑
毛圆线虫	阿苯达唑	甲苯达唑
鞭虫	甲苯达唑	阿苯达唑，伊维菌素
绦虫		
囊虫病	阿苯达唑	吡喹酮
裂头绦虫	吡喹酮	
犬复孔绦虫	吡喹酮	
棘球绦虫	阿苯达唑	吡喹酮
微小膜壳绦虫	吡喹酮	
牛带绦虫	吡喹酮	
猪带绦虫	吡喹酮	

（续 表）

微生物或疾病[b]	首选药物	其他药物
吸虫		
华支睾吸虫	吡喹酮	阿苯达唑
肝片形吸虫	三氯苯达唑	
肠吸虫	吡喹酮	
结合次睾吸虫	吡喹酮	
麝猫后睾吸虫	吡喹酮	
肺吸虫	三氯苯达唑	吡喹酮
血吸虫	吡喹酮	

注：[a] 改编自参考文献[1]；[b] 并不是所有的寄生虫感染情况都列在上面，但常见的寄生虫都包括在内

通过本章，笔者会指出哪些抗寄生虫药物目前已经被美国 FDA 批准。本文末的附录列出了其他国家和地区药物监管机构名称。

一、抗蠕虫药物［译者注：原文为驱虫药（anthelmintic）］

（一）苯并咪唑类

苯并咪唑类（benzimidazoles）化合物是一类广谱抗寄生虫药物，对许多蠕虫和某些原虫感染有效。苯并咪唑类的所有成员都包含一个具有苯的双环结构。甲苯达唑（mebendazole）和阿苯达唑（albendazole）是两种广泛使用的该类药物。甲苯达唑是 5-苯甲酰基-2-苯并咪唑氨基甲酸，阿苯达唑为甲基-5-（丙硫基）-2-苯并咪唑氨基甲酸酯。这两种药物成本低、疗效高和依从性好，从而广泛应用于人类寄生虫感染。其主要适应证分别见表 152-3 和表 152-4。虽然甲苯达唑已被美国 FDA 批准用于治疗多种线虫感染，但甲苯达唑目前还没有在美国上市。而阿苯达唑作为治疗许多寄生虫感染的一线首选药物，除了用于治疗包虫病（hydatid）和脑囊虫病（neurocysticercosis），该药在所有未核准的适应证中使用时仍需做进一步研究[1]。

表 152-3 阿苯达唑的主要适应证[a]

适应证	常用剂量	疗效报道
细粒棘球绦虫	15 mg/(kg・d)（最大 800 mg），分 2 次，通常最少 1～6 个月	临床治愈，1/3 的患者囊肿消失，另外 30%～50% 的患者放射学表现改善，联合吡喹酮治疗可以提高抗寄生虫作用[b]
囊虫病	15 mg/(kg・d)（最大 800 mg），分 2 次，一般 8 天（8～30 天）	75%～95% 的囊壁组织破坏，40%～70% 的患者显示所有活动囊虫消除，联合吡喹酮治疗可以提高杀囊虫效果[c]
蛔虫	单次 400 mg	平均治愈率 95%～98%，产卵率降低 99%～100%
皮肤幼虫移行症	400 mg/d，持续 3 天	没有大型临床试验；通常适用重症或播散性感染
蛲虫	400 mg，重复 2 周使用	治愈率接近 100%
钩虫	单次 400 mg	治愈率 70%～90%，产卵率降低 85%～100%
鞭虫	400 mg，持续 3 天	治愈率 35%～70%，产卵率降低 50%～90%
弓首蛔虫病	400 mg 每天 2 次，持续 5 天	没有大型临床试验
淋巴丝虫病	单次 400 mg	联合多西环素、DEC 或伊维菌素，微丝蚴减少 98%～99%，持续时间更长
罗阿丝虫	单次 400 mg	无杀微丝蚴效果，但伴随产蚴减少或成虫死亡有部分杀大丝虫效果
十二指肠贾第鞭毛虫	400 mg/d，持续 5 天	治愈率 80%～97%
棘颚口线虫	400 mg 每天 2 次，持续 21 天	没有大型临床试验

注：[a] 改编自参考文献[1]；[b] 改编自参考文献[48]；[c] 改编自参考文献[43]

表 152-4 甲苯达唑的主要适应证[a]

适应证	常用剂量	疗效报道
蛔虫	单次 500 mg 或 100 mg，每天 2 次，持续 3 天	平均治愈率 95%～98%，产卵率降低 99%～100%
蛲虫	单次 100 mg，2～3 周后重复使用	平均治愈率达 95%
钩虫	单次 500 mg 或 100 mg，每天 2 次，持续 3 天	治愈率 15%～30%，产卵率降低 60%～95%，每日服用甲苯达唑 500 mg，持续 3 天，可达到 70% 治愈
鞭虫	100 mg，每天 2 次，持续 3 天	治愈率 70%～90%，产卵率降低 99%～95%
弓首蛔虫病	100～200 mg，每天 2 次，持续 5 天	没有大规模临床试验

注：[a] 改编自参考文献[1]

本类药物的其他成员包括氟苯达唑（flubendazole）、噻苯达唑（thiabendazole）和三氯苯达唑（triclabendazole）。氟苯达唑是甲苯达唑的对氟同系物，具有与甲苯达唑和阿苯达唑相同的治疗机制。它已在欧洲获得许可用于治疗肠道线虫，但在美国没有获得许可。动物模型肠道外给药显示出对丝虫成虫具有良好的效果[2]。它对细粒棘球绦虫的原头节也具有作用，但对人体包虫病还没有相关研究资料[3]。噻苯达唑、2-(4-噻唑基)-1-氢-苯并咪唑和其他苯并咪唑类药物有相似的作用机制，但常伴有不良反应。现在它已被其他抗蠕虫药物[译者注：原文为驱虫药（anthelmintic）]替代[4]，但有时仍然用于局部治疗皮肤幼虫移行症。三氯苯达唑是一种新型咪唑衍生物，作为兽药使用了许多年，其作用于微管，导致寄生虫蠕动减弱。它是片形吸虫病（fascioliasis）的治疗药物，作用于成虫和未成熟虫体[5]，尽管动物中出现对其耐药从而对于人类患者的治疗构成威胁[6-9]。它也可用于治疗肺吸虫病（paragonimiasis）[1,10]。三氯苯达唑耐受性好，很少有明显的不良反应，但由于缺乏足够的安全性数据，不建议在妊娠期使用。它被美国 FDA 作为实验性药物，可从美国疾病预防控制中心（CDC）获得用于治疗肺吸虫病，但目前还没有普及使用。上述 3 种药物不作进一步讨论。

1. 作用机制 阿苯达唑和甲苯达唑的抗寄生虫效果主要在于它们可以与寄生虫的细胞骨架蛋白 β-微管蛋白结合，从而抑制微管蛋白聚合成微管[11]。寄生虫肠道细胞微管合成的中断导致吸收功能降低。此外，甲苯达唑和阿苯达唑可以直接抑制寄生虫对葡萄糖的吸收，导致寄生虫糖原耗竭，没有足够的能源来源合成 ATP，从而不能繁殖或存活[12-13]。虽然哺乳动物宿主也含有微管蛋白，但苯并咪唑类药物与寄生虫微管蛋白的亲和力是宿主的数百倍，因而对宿主毒性微小[4]。

2. 药代动力学 苯并咪唑类药物难溶于水，因此口服时吸收不佳。尽管这限制它们对组织内寄生虫的作用，但是有助于减小其毒性，增强治疗许多肠道寄生虫感染的功效[14]。甲苯达唑口服吸收率<20%，血浆浓度峰值见于服药后 2～4 h。它在肝中被代谢为无活性的化合物，排入胆汁，主要从粪便排出。血浆蛋白质结合率为 95%，血清半衰期为 2.5～5.5 h。血清中浓度随个体情况差异显著，但在组织中和棘球蚴包囊中的浓度都偏低[15]。

阿苯达唑口服后生物利用度也较低，吸收率<10%[16]。阿苯达唑与高脂饮食搭配可以显著提高其生物利用度高达 5 倍。它在肝中被迅速代谢，血浆中原药浓度可忽略不计。然而它的主要代谢产物阿苯达唑亚砜也具有驱虫活性[17]。这导致在大多数情况下阿苯达唑比甲苯达唑疗效更好。阿苯达唑亚砜与蛋白结合率为 70%，广泛分布于全身。阿苯达唑亚砜单次剂量为 15 mg/kg，2～5 h 后血浆浓度达到峰值，但个体之间差异极大，范围从 0.45～2.96 mg/L[18]。阿苯达唑可诱导代谢其自身的细胞色素 P450 酶。与西咪替丁和地塞米松联用可提高药物水平，增加血药浓度-时间曲线下面积（area under the plasma concentration-time curve，AUC）[19]，与吡喹酮联用可以提高阿苯达唑药物水平[20-22]。服药后可以在尿、胆汁、肝、包囊液和脑脊液中检测到阿苯达唑亚砜。血浆中的浓度分别是包囊液和脑脊液的 3～10 倍和 2～4 倍[23-24]，尽管血浆水平和其他体液水平之间存在个体化差异[25]。阿苯达唑亚砜的半衰期约 9 h。它进一步被氧化的非活性化合物，如阿苯达唑砜，主要通过尿排出。

无论是甲苯达唑还是阿苯达唑都无法透析出去。对于肾损伤的患者无需调整剂量，但是如果有明显的肝功能不全应考虑减少剂量。苯并咪唑

类药物不可用作静脉制剂。

3. 抗虫谱　苯并咪唑类药物对蠕虫成虫和发育中的胚胎有效。阿苯达唑和甲苯达唑具有相似且广泛的抗虫谱(表 152-3 和表 152-4)。这两种药物都可以有效治疗许多常见的肠道线虫感染,例如蛔虫病、鞭虫病、蛲虫病和钩虫病。甲苯达唑三日疗法或阿苯达唑的 1～3 日疗法都可以用于患者治疗(对于鞭虫感染可以适当延长时间)[26-27]。两种药物单剂量常用于流行区肠道线虫大规模或特定人群治疗。大多数情况下优先选用阿苯达唑,但阿苯达唑针对严重鞭虫感染是次选,而这种情况甲苯达唑可能更合适。两种药物对不同寄生虫感染的疗效根据患者的感染程度、所在地域、诊断检测方法和治疗后随访持续时间等不同而存在差异[27]。

甲苯达唑和阿苯达唑对其他类型的线虫感染,如广州管圆线虫病、毛圆线虫病、毛细线虫病、旋毛虫病、颚口线虫病(gnathostomiasis)、弓首蛔虫病(toxocariasis)和皮肤幼虫移行症也有效。此外,阿苯达唑更多的与 DEC 或伊维菌素(ivermectin)联合用药治疗班氏丝虫病(bancroftian)、布鲁丝虫病(brugianfilariasis)和罗阿丝虫病(loiasis),该药作为这些感染大规模化疗计划中单剂量方案的一部分特别有效[28]。尽管阿苯达唑对粪类圆线虫有一定的效果,但伊维菌素的治愈率始终较高,是推荐治疗的选择。

甲苯达唑和阿苯达唑对治疗某些绦虫感染有效,但阿苯达唑由于具有更好的药代动力学,仍然是首选药物,而且被作为由细粒棘球绦虫引起的包虫病的内科治疗或辅助治疗的选择药物。长期使用(至少 10 年)阿苯达唑也可用于治疗不能手术的泡型包虫病,或用作多房棘球绦虫感染辅助治疗。此外,阿苯达唑也用于治疗脑实质型脑囊虫病。尽管阿苯达唑主要被认为是抗蠕虫药物[译者注:原文为驱虫药(anthelmintic)],但也可作为贾第鞭毛虫病的替代药物[29]。

4. 不良反应　短期使用苯并咪唑类药物甲苯达唑和阿苯达唑的不良反应少见,通常比较温和。可能会出现短暂腹痛、恶心和腹泻,也有头痛、头晕、失眠和过敏现象的报道。长期的大剂量治疗,如用于包虫病时,1%～5%的患者血清转氨酶会出现短暂并可逆的升高。偶尔也会发生脱发(<1%)和可逆的白细胞减少症(<1%)。需要停药的情况较少,但已有阿苯达唑引起全血细胞减少的死亡病例报道[30]。未确诊的脑囊虫病使用阿苯达唑治疗后引发癫痫的报道[31-32]罕见。

当甲苯达唑(妊娠目录 C 类)用于孕妇时,自然流产或胎儿畸形的发生率与对照人群相比没有显著增加。也没有阿苯达唑(妊娠目录 C 类)致畸和妇女在妊娠期间疏忽性服用导致胎儿发育不良的报道[33-34]。然而,动物模型研究显示苯并咪唑类药物可能致畸及对胚胎产生影响。由于没有这些药物对人类致畸或流产方面良好的安全预期资料,除非证明对胎儿有潜在的益处,无论阿苯达唑还是甲苯达唑都不建议在妊娠期间使用,特别是在早期妊娠时期。阿苯达唑和甲苯达唑在母乳排出量极低,虽然对婴儿伤害概率低,但应慎用于哺乳期妇女[35]。

(二)吡喹酮

吡喹酮(praziquantel)是合成类杂环异喹诺酮-吡嗪衍生物。主要适应证见表 152-5。美国 FDA 批准使用该药[1]。它对几乎所有吸虫和绦虫都有独特活性,但不可用于治疗线虫感染[4]。

表 152-5　吡喹酮的主要适应证[a]

适应证	常用剂量	疗效报道
肝吸虫	75 mg/(kg·d),分 3 次,持续 2 天	治愈率 85%～100%
囊虫	50～100 mg/(kg·d),分 3 次,通常 15 天(1～30 天)	与阿苯达唑联合用药能提高杀囊虫效果[b]
后睾吸虫病	75 mg/(kg·d),分 3 次,持续 2 天	治愈率>95%
肠吸虫	75 mg/(kg·d),分 3 次,持续 1 天	没有临床数据
肺吸虫病	75 mg/(kg·d),分 3 次,持续 2 天	肺部感染治愈率>95%(异位感染部位可能降低)
血吸虫病	40～60 mg/(kg·d),分 2～3 次,持续 1 天	治愈率 75%～100%,未治愈患者中产卵率降低 90%～95%
绦虫(肠道期)	单次剂量 5～25 mg/kg	对于绦虫、裂头绦虫及膜壳绦虫感染治愈率>95%

注:[a] 改编自参考文献[1];[b] 改编自参考文献[44]

1. 作用机制 吡喹酮诱导寄生虫外膜超微结构改变，提高钙离子的渗透性。钙离子积聚在寄生虫胞质中，导致肌肉收缩，最终使成虫麻痹。通过破坏体壁，吡喹酮使寄生虫的抗原暴露引起宿主免疫应答[36-38]。这些效应导致虫体从肠道脱落并随肠道蠕动被清除。

2. 药代动力学 吡喹酮可口服给药，超过80%的成分被快速吸收。与脂肪或高糖类饮食同服可增加血清中药物浓度[39-40]。吡喹酮以S和R立体异构体的外消旋混合物形式生产和给药：驱虫特性与(R)-吡喹酮有关，苦味主要与非活性的S异构体有关[38,40]。无肠道外制剂。该药物在肝中进行生物转化，代谢物主要通过尿排出。糖皮质激素、苯妥英和苯巴比妥可诱导肝中细胞色素P450介导的吡喹酮代谢。因此，当合用这些药物时，血清中吡喹酮水平会更低。西咪替丁可抑制细胞色素P450介导的代谢，同时给药可以增加血清中的吡喹酮水平。服药1.5～2 h后血清中药物浓度达到峰值，给予40 mg/kg的剂量，峰值为1.007～1.625 mg/L[41]，曲线下面积2100～5400 ng・h/ml[40,42]。吡喹酮可以通过血-脑脊液屏障，但脑脊液中浓度仅为血浆的20%～25%[14,39]。蛋白结合率为80%，血清半衰期为1～3 h。吡喹酮不可透析，无论肾功能或肝功能不全，都不建议调整剂量。

3. 抗虫谱 吡喹酮对许多吸虫的幼虫和成虫阶段都具有活性。它是血吸虫病的首选药物并且对所有感染人的血吸虫有效。它既可用于个体治疗也可用于大规模化疗从而降低传播和流行。吡喹酮也用于治疗后睾吸虫病(opisthorchiasis)、华支睾吸虫病、肺吸虫病及肠道吸虫感染，包括姜片虫病、异形吸虫病和后殖吸虫病。相对于其他吸虫感染，吡喹酮对于肝片形吸虫(*Fasciola hepatica*)感染的疗效未得到证实。

许多绦虫感染，也可使用吡喹酮治疗。吡喹酮可应对大多数绦虫感染，包括带绦虫、裂头绦虫以及膜壳绦虫引起的感染。由于吡喹酮不能杀死虫卵，应采取预防措施阻断自身感染和实验室获得性感染，特别对猪带绦虫而言。吡喹酮也可作为阿苯达唑的替代药物或最好作为辅助药物治疗脑囊尾蚴病[43-44]。

吡喹酮也可与阿苯达唑联合使用治疗棘球绦虫感染。吡喹酮在体外具有很高的杀灭原头蚴活性，有报道表明两药联合的疗效优于任何一种单药治疗[45-48]。

4. 不良反应 吡喹酮的不良反应一般较轻微，但许多研究表明，30%以上的患者会产生不良反应。常见的不良反应包括头晕、嗜睡、头痛、恶心和腹痛，很少发生过敏反应[49-50]。严重的不良反应罕见，但对于脑囊尾蚴病患者给药可能导致其癫痫和与炎症反应相关的神经后遗症[51]。

吡喹酮(妊娠目录B类)在动物实验没有表现出致畸作用，但在大鼠中观察到流产率增加。虽然关于人体的安全性数据很少，但对孕妇或未出生的胎儿存在非常低的不良影响[52]，当妊娠期间使用吡喹酮时，并没有观察到流产、早产或先天性异常的增加[25,53]。因此，吡喹酮可以在早孕期后使用。已有报道在哺乳期间服用吡喹酮并无不良影响，但它可以从人乳汁中排出，建议治疗当天和随后72 h内停止母乳喂养。然而，根据已有的安全性数据，2002年世界卫生组织推荐其可以考虑在孕妇和哺乳期妇女中使用[54]。FDA批准其用于4岁及以上的儿童。

(三)伊维菌素

伊维菌素(ivermectin)是阿维菌素的半合成大环内酯衍生物，阿维菌素是从放线菌阿维菌素链霉菌中提取的天然物质。其使用的主要适应证见表152-6。它最初被开发作为兽药使用，现在广泛用于人体。伊维菌素是一种有效的口服药物，具有相对广谱的驱虫活性。它已通过美国FDA批准用于口服治疗盘尾丝虫病和非复杂性粪类圆线虫病[1]，并可作为头虱的局部治疗。

1. 作用机制 伊维菌素使氯离子通过谷氨酸控制的氯离子通道透过神经和肌肉细胞膜，导致受影响的细胞超极化，从而使虫体麻痹、死亡[4,55-59]。据推测，伊维菌素可能是神经递质γ-氨基丁酸的拮抗药[60]。虽然哺乳动物脑组织中发现了伊维菌素特异性结合位点，但是伊维菌素与寄生虫内位点的亲和力比哺乳动物组织高100倍。

2. 药代动力学 伊维菌素可口服给药。FDA没有批准伊维菌素用于肠道外给药，但对于危重的无法口服治疗的播散性粪类圆线虫病患者可以通过直肠和皮下途径给药[61-64]。该药口服后迅速吸收。尽管建议空腹用水冲服以减少不良反应，但与高脂饮食共用时其生物利用度提高约2.5

表 152-6 伊维菌素的主要适应证[a]

适应证	常用剂量	疗效报道
蛔虫	单次 150～200 μg/kg	治愈率 78%～99%
皮肤幼虫移行症	200 μg/(kg·d)(通常为 12mg),持续 1～2 天	治愈率 77%～100%
棘颚口线虫	200 μg/(kg·d),持续 2 天	治愈率 76%～95%
盘尾丝虫	单次 150 μg/kg 剂量,每 6～12 个月重复,直到症状消失	皮肤微丝蚴减少 85%～95%,1 年内保持抑制水平>90%
粪类圆线虫	200 μg/kg,分 2 次(连续数天或间隔 2 周给药)	非复杂性感染(正常或免疫功能低下患者)的治愈率 85%～97%
鞭虫	200 μg/(kg·d),持续 3 天	治愈率 35%～84%
体外寄生虫:疥螨和虱子	200 μg/kg,疥螨 2 周后重复使用	治愈率几乎 100%

注:[a] 改编自参考文献[1]

倍[65]。伊维菌素可在肝中代谢,从粪便中几乎完全排出。血清中药物浓度峰值在服药后 4～5 h 出现,之前有报道称单次给药 12 mg,峰值浓度约为 46 μg/L[15]。血浆蛋白结合率高,半衰期 10～18 h。药物在脂肪组织中积聚,不易穿过血-脑脊液屏障[66]。

3. 抗虫谱 伊维菌素是治疗盘尾丝虫病和粪类圆线虫病的首选药物[1,68]。盘尾丝虫感染时,伊维菌素对成虫生存能力影响不显著,但可抑制微丝蚴的释放,是一种强效的杀微丝蚴药,并可在数月内使微丝蚴血症持续降低[56]。在盘尾丝虫流行区,它既可以用于个体治疗,也可以用于大规模化疗。伊维菌素与多西环素联合治疗的作用正在探索中[69]。对于免疫功能正常的非复杂性粪类圆线虫病患者,伊维菌素具有显著的疗效[60]。对于播散性病例,伊维菌素需要每天给药直到粪便和痰检查幼虫阴性为止。

伊维菌素对于班氏吴策线虫(*Wuchereria bancrofti*)、马来布鲁丝虫(*Brugia malayi*)和罗阿罗阿丝虫(*Loa loa*)的微丝蚴也有作用,对于这些丝虫感染的成虫生存力抑制效果不显著。只有持续给药才能降低微丝蚴的产生,不能替代一线药物 DEC。联合阿苯达唑和(或)DEC 可以增加疗效[70]。伊维菌素对于奥氏曼森线虫(*Mansonella ozzardi*)和链尾曼森线虫(*M. streptocerca*)的微丝蚴也有抑制作用。

伊维菌素对于许多肠道寄生虫包括蛔虫、鞭虫、蛲虫和皮肤幼虫移行症也有疗效[57,71-74]。但是由于阿苯达唑具有广泛的适应证和极好的疗效,伊维菌素并不作为这些疾病的一线药物。伊维菌素也可用于颚口线虫病治疗[75-76],但对于吸虫和绦虫没有作用。伊维菌素除具有抗蠕虫活性外,还可用于外生寄生虫感染,如疥螨和虱子,可以口服或局部用药。

除了抗蠕虫活性,伊维菌素可能通过杀死从伊维菌素治疗过的人身上吸血的蚊子来减少疟疾的传播[77-78]。有证据表明它能抑制肝细胞内疟原虫的发育,减少随后血流阶段疟原虫血症[79]。因此,伊维菌素可能在控制疟疾传播中发挥作用。

4. 不良反应 伊维菌素耐受性较好,大多数不良反应是由于寄生虫死亡后的产物所引发的宿主免疫反应所致,而不是药物本身的毒性反应。不良反应包括发热、皮疹、头晕、瘙痒、肌肉痛、关节痛和淋巴结肿大,这些症状的严重程度与治疗前感染的严重程度相关,而与血中伊维菌素浓度无关[80]。转氨酶异常偶有报道。严重的不良反应偶有发生,包括对死亡微丝蚴产生的变态反应(Mazzotti 反应)。这种过敏反应的特征包括瘙痒、水肿、发热和系统性低血压。然而,这些反应主要见于荷虫量高的患者。罗阿丝虫感染者体内微丝蚴数量增加时,伊维菌素治疗可导致致死性脑病[81],应避免使用。

当小鼠、大鼠和兔重复给药剂量分别 0.2、8.1 和 4.5 倍于人类推荐最高剂量时,伊维菌素(妊娠目录 C 类)可致畸。3 个物种的致畸特点均为腭裂,在兔中同时观察到杵状前爪。这些发育结局仅在给予等于或接近对妊娠母体毒性的药物剂量时发现[14,56]。尽管伊维菌素治疗 203 名孕妇,其胎儿致命风险不高于对照组,但没有足够的数据可以推荐其在孕妇中使用,建议妊娠早期后给药比较安全[82-84]。该药在母乳中排出浓度低,应尽可能避免哺乳期妇女使用。体重小

于15 kg儿童不推荐服用。

(四)乙胺嗪

乙胺嗪(diethylcarbamazine,DEC)是哌嗪衍生物,主要用于丝虫感染。主要适应证见表152-7。DEC在美国未获得使用许可证,但可以通过CDC签署研究性新药协议(Investigational New Drug program)获得。

表152-7 DEC的主要适应证[a]

适应证	常用剂量	疗效报道
罗阿丝虫	最高9 mg/(kg·d),分3次,持续12天	很少有大规模试验,但<50%的患者一个疗程是有效的
班氏丝虫和马来丝虫感染	最高6 mg/(kg·d),分3次,持续12天(或重复单次剂量)	微丝蚴血症减少大于90%~99%,但消灭成虫通常需要增加疗程

注:[a] 改编自参考文献[1]

1. 作用机制 DEC的作用机制不明确。它主要是一个杀微丝蚴药,主要作用在于抑制花生四烯酸代谢并改变微丝蚴表层膜,通过宿主免疫反应增强其杀虫能力[12-13]。在某些条件下也具有杀大丝虫活性,这可能通过对成虫的超极化和固定作用来实现[85]。

2. 药代动力学 DEC仅有片剂,易溶于水,口服后几乎完全吸收。在肝中代谢,但超过50%的原药从尿中排出。与蛋白结合率几乎可忽略不计,在组织中广泛分布。它极易透过血-脑脊液屏障。据报告单次给药0.5 mg/kg 1~2 h后,血浆峰值水平为100~150 μg/L[86]。DEC的半衰期是2~10 h。尿pH为碱性时肾排泄减少,肾功能障碍的患者需要降低药物剂量。

3. 抗虫谱 DEC是一种有效的杀微丝蚴药物,对班氏丝虫、马来丝虫、帝纹丝虫、盘尾丝虫、罗阿丝虫和链尾曼森线虫有效,但其对常现曼森线虫(*Mansonella perstans*)和奥氏曼森线虫的微丝蚴几乎无效或疗效甚小[4]。近50年它一直是淋巴丝虫病的首选药物。它单独或与伊维菌素、阿苯达唑或多西环素联合可用于个体治疗和大规模群体化疗。它主要是一个杀微丝蚴药,尽管对于班氏丝虫、马来丝虫、帝纹丝虫和罗阿丝虫的感染有一些杀大丝虫活性[87-89]。DEC也被用于治疗弓首蛔虫内脏幼虫移行症(toxocaral visceral larva migrans),但阿苯达唑现在是首选药物,因为它具有较好的安全性。

4. 不良反应 DEC的不良反应包括轻微的头痛、头晕、食欲减退、恶心和关节痛。该药物引起丝虫感染个体的不良反应不是药物本身而是宿主反应所致,部分由于丝虫释出沃尔巴克体(*Wolbachia*)致成虫破损(局部反应)和微丝蚴死亡(全身性反应)。这些反应在淋巴丝虫病中相对温和,在罗阿丝虫病中不常见,但在盘尾丝虫病和重度罗阿丝虫感染时反应严重,导致剧烈瘙痒、皮疹、发热、低血压和脑病。使用DEC治疗盘尾丝虫时可能发生潜在致死性的变态反应(Mazzotti反应)和严重的眼部不良反应。所以DEC禁用于盘尾丝虫感染治疗。DEC禁用于重度罗阿丝虫感染以避免潜在的致死性脑病。DEC在动物实验中未表现出致畸性,但可能会增加流产的风险,因此,应尽可能避免在妊娠期使用[14,90]。它不从母乳中排出,所以哺乳期中可以安全使用。

(五)双羟萘酸噻嘧啶

双羟萘酸噻嘧啶(pyrantel pamoate)是一种四氢嘧啶,是针对线虫相对广谱的药物。与苯并咪唑相比不良反应多,疗效低,因此现在已经基本上被取代。在美国,无需处方就可广泛使用[1]。

1. 作用机制 噻嘧啶是一个去极化神经肌肉性阻滞剂。它通过释放乙酰胆碱及抑制蠕虫乙酰胆碱酯酶的释放发挥驱虫效果,导致神经节受体刺激与成虫痉挛性麻痹。蠕虫从肠壁脱落并通过正常蠕动从粪便排出。

2. 药代动力学 噻嘧啶口服给药,但几乎不溶于水,因此胃肠道吸收不佳。血清中峰值出现于服药后1~3 h。超过50%的原药从粪便排出。所吸收的药物部分在肝代谢。与食物没有显著的相互作用。

3. 抗虫谱 噻嘧啶对于治疗蛔虫病、钩虫和

蛲虫感染疗效极佳[27]。对毛圆线虫属也有一些疗效，对鞭虫无效。然而，联合间羟基苯酚类似物双酚氧噻酮用药能够增加其疗效[74,91]。

4. 不良反应 噻嘧啶的一般耐受性良好，它导致的不良反应包括厌食、恶心、呕吐、腹部绞痛和腹泻。它也与神经毒性效应如头痛、头晕、嗜睡和失眠相关。也有报道称其会导致肝酶类短暂升高。一个研究报道称肾病综合征与其服用时间相关[92]。动物研究并未显示其对胎儿的不良反应，它已用于治疗妊娠患者，对胎儿无不良影响（妊娠目录 C 类）[93]。小于 2 岁的儿童不推荐使用。

二、抗蠕虫［译者注：原文为驱虫药(anthelmintic)］/原虫作用的药物——硝唑尼特(nitazoxanide)

硝唑尼特是 5-硝基噻唑衍生物，对多种肠道原虫、蠕虫和厌氧菌具有广谱活性。主要适应证见表 152-8。最初作为兽用驱虫药(anthelmintic)治疗肠道线虫、绦虫和肝吸虫[94]。美国 FDA 已经批准它用于治疗儿童和成人隐孢子虫和十二指肠贾第鞭毛虫感染引起的腹泻[94-95]。

（一）作用机制

硝唑尼特抑制无氧能量代谢必需的丙酮酸铁氧还蛋白氧化还原酶，这是它对厌氧原虫和细菌（如阴道毛滴虫、溶组织内阿米巴和产气荚膜梭菌）的主要作用机制，但是抗原虫还涉及其他作用机制[96]。硝唑尼特抗蠕虫（如短膜壳绦虫）的确切作用机制尚未明确。

（二）药代动力学

硝唑尼特以片剂或混悬液的形式口服给药。与食物一起服用，其生物利用度几乎翻了一番[97]。它经胃肠吸收，约 1/3 的口服剂量经尿排出，2/3 经粪便排出[98-99]。血液中硝唑尼特迅速水解形成活性代谢产物替唑尼特。500 mg 硝唑尼特口服剂量产生的替唑尼特最大血浆浓度为 2 mg/L (6.5 μM)，其血浆半衰期为 1～2 h[100]。替唑尼特与血浆蛋白结合率很高（>99%），尿清除半衰期为 7.3 h[101]。替唑尼特经过葡萄糖醛酸化形成替唑尼特葡萄糖醛酸。硝唑尼特在血浆、尿、胆汁和粪便中检测不到，但替唑尼特在血浆、尿、胆汁和粪便中可检测到，替唑尼特葡萄糖醛酸在血浆、胆汁和尿中可被检测到[99]。硝唑尼特在肝或肾功能受损患者的药代动力学尚未研究，因此，对这些患者必须谨慎用药[94]。

（三）抗虫谱

虽然硝唑尼特具有广谱抗寄生虫活性[102-103]，但 FDA 只批准用于治疗隐孢子虫和十二指肠贾第鞭毛虫感染，治疗其他感染中的作用不明确。

（四）不良反应

硝唑尼特的耐受性良好，其不良反应类似于安慰剂。3%～4% 的患者出现轻度和短暂的不良反应，主要与胃肠道相关（腹痛、腹泻和恶心）的表现[104]。对人心电图、血液学、临床化学或尿分析等参数无显著不良影响[96,105]。硝唑尼特对孕妇（妊娠目录 B 类）和哺乳期妇女安全性方面数据很少[94]。

表 152-8 硝唑尼特的主要适应证

适应证	常用剂量[a]	疗效报道
微小隐孢子虫	免疫功能正常的 1～11 岁儿童与成人：每天 2 次，持续 3 天[b]	治愈率 52%～80%
	免疫功能低下的患者 1000 mg，每天 2 次，持续 2～8 周	治愈率 18%～67%（HIV 阳性患者疗效随着 $CD4^+$ 细胞计数而变化）
十二指肠贾第鞭毛虫	每天 2 次，持续 3 天[c]	治愈率 71%～94%

注：[a] 改编自参考文献[94]；[b] 硝唑尼特剂量如下：1～3 岁儿童，100 mg 每天 2 次，持续 3 天；4～11 岁儿童，200 mg 每天 2 次，持续 3 天；成年人，500 mg 每天 2 次，持续 3 天。[c] FDA 批准使用许可

三、抗疟药(antimalarials)

一些药物被批准用于治疗疟疾,最常用的药物见于表 152-9。

(一)喹啉衍生物

喹啉衍生物(quinoline derivatives)可分为四组:4-氨基喹啉(4-aminoquinolines)、金鸡纳生物碱(cinchona alkaloids)、合成化合物如甲氟喹(mefloquine)和卤泛曲林(halofantrine)、8-氨基喹啉(8-aminoquinolines)。相关药物哌喹(piperaquine),是一种双喹啉,现在经常与青蒿素衍生物联合治疗疟疾。虽然该药已在欧洲使用,但并未获 FDA 批准。

1. 4-氨基喹啉 4-氨基喹啉包括氯喹(chloroquine)、羟氯喹和阿莫地喹。其中氯喹应用最广。它是一种廉价的、安全的药物,已广泛用于人类各种疟原虫感染的治疗和预防,但在大多数疟疾流行地区恶性疟原虫(*Plasmodium falciparum*)对氯喹产生了耐药性。羟基氯喹是合成化合物,与 4-氨基喹啉具有相同的抗虫谱、相似的药代动力学和不良反应。阿莫地喹是另一个与 4-氨基喹啉有相同作用机制和抗虫谱的药物。据报道,阿莫地喹比氯喹能更有效清除寄生虫,但由于它罕见的严重不良反应,其使用受到了一定限制,如下文所述。该药尚未获得美国 FDA 批准[1]。

表 152-9 疟疾的治疗方案[a]

临床疾病	用于治疗的主要药物	替代药物[b]
任何种类引起的严重疟疾(初期治疗)[c]	静脉注射或肌内注射青蒿琥酯	静脉注射奎宁或奎尼丁
非复杂性恶性疟	ACT	硫酸奎宁+克林霉素或多西环素
无合并症间日疟和卵形疟(氯喹耐药地区)	ACT 随后使用伯氨喹	硫酸奎宁+克林霉素或多西环素,随后使用伯氨喹
无合并症的间日疟和卵形疟(氯喹敏感地区)	ACT 或氯喹,随后使用伯氨喹	硫酸奎宁+克林霉素或多西环素,随后使用伯氨喹
三日疟原虫或诺氏疟原虫	ACT 或氯喹	硫酸奎宁+克林霉素或多西环素

注:[a] 改编自参考文献[111]。ACT. 青蒿素联合治疗。[b] 阿托伐醌-氯胍还可以考虑在疟疾流行区以外的旅行者中治疗非复杂性疟疾,前提是阿托伐醌-氯胍没有被用作疟疾化学预防。[c] 胃肠外治疗应至少持续 24 h。一旦患者接受了至少 24 h 的胃肠外治疗,并且可以耐受口服治疗,就可以按照非复杂性疟疾治疗

(1)作用机制:4-氨基喹啉主要作用机制是通过非酶性作用抑制血红素聚合。红细胞内无性期疟原虫在含血红蛋白的囊泡中浓集喹啉环化合物。在没有药物的情况下,疟原虫降解宿主红细胞血红蛋白为寄生虫生长提供必需的氨基酸营养。血红蛋白降解产生游离的亚铁血红素,以铁原卟啉(ferriprotoporphyrin)Ⅸ形式存储在红细胞内。铁原卟啉Ⅸ对寄生虫具有毒性,常被聚合成无毒的疟色素(hemozoin)。在药物作用下,亚铁血红素向疟色素转化受到抑制,导致对疟原虫有毒产物聚集,从而引起寄生虫死亡[106]。这些药物通过抑制磷酸掺入 DNA、RNA 及抑制 DNA 与 RNA 聚合酶来抑制蛋白质的合成[13]。氯喹也可以提高囊泡的 pH[107]。

(2)药代动力学:4-氨基喹啉在组织中广泛分布,半衰期长。尽管它们的化学结构相似,但其生物转化和清除途径不同[108]。

氯喹有口服和注射两种形式,在世界各地有许多不同的配方。推荐口服给药,因为经肠外途径快速给药可引起毒性血浆峰浓度和致死性心血管衰竭的危险[109]。口服给药后,氯喹迅速从胃肠道吸收,生物利用度超过 75%,食物对药物吸收有不同的影响。该药物广泛分布在全身组织中,并在大脑中达到高水平[110]。氯喹可与皮肤和眼的黑色素细胞结合,所以它也可以在这些部位达到很高的水平。个体间血浆峰浓度有显著性差异,但在开始口服标准治疗剂量(分别在 0 h 和 24 h 给药 10 mg/kg,随后在 48 h 给药 5mg/kg)后 3 h 内[111],血液浓度维持在 1 mmol/L 以上至少 4 天[112]。幼儿可能需要更高的剂量达到相似的血浆浓度[113-114]。氯喹血浆蛋白结合率约 60%,半衰期 3~6 天。30%~50%的药物在肝内代谢为无

活性的化合物，其余部分随尿排出。重度肾和肝衰竭患者的治疗剂量需减少(通常是正常剂量的50%)。氯喹是不可透析的。

相比之下，阿莫地喹是一种前体药物，口服后几乎完全被代谢成有生物活性产物去乙基阿莫地喹。另外，其药代动力学性质与氯喹类似但分布容积较小。

(3)抗虫谱：4-氨基喹啉是高效、快速的红内期裂殖体杀灭药，可用于治疗和预防所有疟原虫敏感株的感染，对组织内裂殖体和红外期没有作用。4-氨基喹啉可杀灭间日疟原虫与三日疟原虫的配子体，但对恶性疟原虫配子体的影响很小。间日疟原虫和卵形疟原虫感染后，还需要伯喹消除肝内休眠体，以防止复发。

目前氯喹仍然是间日疟原虫、诺氏疟原虫、三日疟原虫和卵形疟原虫治疗的一线药物，但间日疟原虫耐药株在全球范围内增多，特别是来自印度尼西亚、东帝汶、巴布亚新几内亚、所罗门群岛的间日疟感染。虽然几乎世界各地的恶性疟原虫已经对氯喹产生耐药性，现已很少用于恶性疟原虫的治疗，但它仍然是治疗恶性疟原虫敏感株的首选药物，也是治疗诺氏疟原虫感染的有效药物[115]。由于阿莫地喹的潜在毒性，不推荐用于疟疾的预防，通常也不作为一线治疗药物。然而，它能比氯喹更快地清除寄生虫且更快速缓解症状，它可能对某些耐氯喹的疟疾病例有效，所以它作为一种替代治疗药物在一些地区使用。

氯喹对溶组织内阿米巴滋养体也很有效，但很少用于此虫，5-硝基咪唑是其首选药物。

(4)不良反应：氯喹味苦。疟疾患者通常可耐受其预防和治疗剂量，长疗程治疗也表现出良好的耐受性。但是它可导致恶心、腹部不适、头晕、视物模糊、视网膜色素沉着、心电图变化、肌肉无力及个别病例出现短暂性的精神症状。它还可引起严重的皮肤瘙痒，尤其是非洲黑种人。如果长期大剂量的给药也会导致不可逆的视神经视网膜炎。如果服用过量，甚至会引起休克、心律失常和死亡。

氯喹用于疟疾治疗或预防的剂量很少有先天性不良反应的报道(妊娠目录 C 类)[116]。然而，氯喹对含嗜黑色素组织如视网膜、虹膜和脉络膜等的亲和力已有报道，但尚无对胎儿风险的确切描述。这是孕妇常用的治疗和预防疟疾的药物，无证据证明其具有致畸性。人们普遍认为，氯喹预防和治疗孕妇疟疾的益处大于对胎儿的潜在风险。少量氯喹可从乳汁中排出。

阿莫地喹比氯喹更易接受，似乎较少导致瘙痒。然而，严重的不良反应，包括粒细胞缺乏症、再生障碍性贫血和药物性肝炎等均有报道。主要是因为长期使用阿莫地喹预防疟疾(平均 7～8 周)[117]，而短期的治疗是较为安全的[118]，目前这种药物已不常用。

2. 金鸡纳生物碱　金鸡纳生物碱、奎宁和奎尼丁均含有喹啉环。奎尼丁是奎宁的非对映异构体。奎宁最初是从南美金鸡纳树皮中提取的，但现在已有化学合成物可用，通常是奎宁的硫酸盐。奎尼丁比奎宁更有活性，也更具有心脏毒性。

(1)作用机制：金鸡纳生物碱的确切作用靶标还不清楚。其可能通过与铁原卟啉Ⅸ形成复合物干扰血红蛋白消化从而导致细胞裂解和裂殖体死亡[119]。它还具有干扰疟原虫 DNA、抑制疟原虫核酸和蛋白质合成的功能。奎宁与某些疟原虫寄生红细胞内的脂肪酸相互作用，防止红细胞溶解并阻止裂殖体成熟[13]。此外，它可升高细胞内 pH，导致寄生虫死亡。

(2)药代动力学：奎宁以硫酸盐形式口服，也可以二盐酸奎宁注射给药。口服后，80%由胃肠道吸收，广泛分布于人体组织，脑脊液中的浓度不到血浆中 10%，与血浆蛋白结合超过 90%。奎宁在肝代谢，与天然药物及其代谢产物在尿中排出[110]，半衰期短，8～12 h，需要每天多次给药。单次服用 650 mg 硫酸奎宁后，健康人血清峰浓度约 3.2 mg/L，而疟疾患者血清峰浓度较高(8.4 mg/L)。当口服奎宁不耐受时，许多国家以静脉注射方式给药，但奎尼丁葡糖酸盐是美国首选的肠道外药物[1]。这 2 种药物具有类似的药代动力学特性。

金鸡纳生物碱在治疗疟疾中的药代动力学性质发生了很大变化，清除率的降低与疾病的严重程度成正比。因此，第 3 天治疗后，剂量应减少 30%～50%，以避免重症患者药物的积累[120]。与能够碱化尿的食物一起服用时，由于肾小管重吸收增加血药浓度也可能会升高。肝功能损害严重的患者建议谨慎服用，肾功能损害的患者需减少剂量。2 种药物都可以部分透析。

(3)抗虫谱：金鸡纳生物碱可用于人体各种疟

原虫感染的治疗，主要用于氯喹耐药的恶性疟原虫，可口服治疗无合并症疟疾，但二盐酸奎宁和葡糖酸奎尼丁肠外制剂用于严重感染患者。

奎宁和奎尼丁是疟原虫红内期裂殖体杀灭药，但对子孢子或红外期影响不大。因此，无法根除间日疟原虫和卵形疟原虫在肝中的休眠子，也无法杀灭恶性疟原虫配子体。尽管东南亚和非洲出现了对这些药物的耐药虫株，它们仍然是世界范围内治疗疟疾的有效药物。但近年来这些药物已被疟疾治疗的一线药物青蒿素衍生物所取代。

奎宁也用于治疗巴贝虫病，但单药无治疗效果，可与克林霉素或阿奇霉素联合用药[1]。

(4)不良反应：奎宁味极苦，可致恶心、呕吐和上腹痛。这也常导致复杂的金鸡纳中毒症状（恶心、耳鸣、烦躁不安和可逆性高音耳聋）。奎宁还可引起高胰岛素性低糖血症，尤其是患有严重疟疾的儿童和孕妇，因为它增加胰腺胰岛素的分泌。严重恶性疟原虫感染患者还伴有严重溶血，有的还有粒细胞缺乏症、血小板减少症、视网膜病变和舌变色等症状。过量服用奎宁可引起共济失调、惊厥和昏迷。

治疗重症疟疾，奎尼丁静脉给药可致患者心律失常，延长 QT 间期、QRS 波变宽、PR 间期延长，因而导致血压过低和室性心律失常，包括尖端扭转型室速。因此，只能在有心脏监护的重症监护室使用。和奎宁一样，奎尼丁也可能导致恶血质和金鸡纳中毒。

尽管在妊娠期间使用奎宁有导致先天缺陷的报道，在妊娠期间给予奎宁对产妇治疗的益处大于对胎儿的潜在风险（妊娠目录 C 类）时可以使用[121-122]。还没有奎尼丁致畸的报道，但已公开的妊娠期研究数据较少[123]。奎宁可致流产，从而导致引产。奎宁有少量可从乳汁分泌，但必要时可用于哺乳期妇女的治疗。

3. 喹啉类化学合成物

(1)甲氟喹：甲氟喹是一种合成的 4-喹啉-甲醇化合物，在结构上与奎宁相关。

1)作用机制：甲氟喹与宿主细胞的磷脂和寄主红细胞内铁原卟啉Ⅸ相互作用[13]。其作用依靠干扰疟原虫生命周期中红内期血红蛋白的消化，可能与奎宁作用机制类似[119]，但不抑制蛋白质的合成。

2)药代动力学：甲氟喹只可口服，食物可提高其生物利用度，不应空腹服用。口服吸收率为 85%，并聚集在红细胞内[124]。蛋白结合率大于 95%，半衰期 2～4 周。由于其半衰期长，甲氟喹常被用于疟疾预防，每周服药 1 次。然而，每周服用甲氟喹时，达到稳定血药浓度则需要约 8 周，所以常推荐负荷剂量。血浆峰浓度时间是 6～24 h，单剂口服 500 mg 或 1000 mg 的甲氟喹，峰浓度分别为 430 μg/L 和 800 μg/L。对于健康的志愿者，每周 1 次服 250 mg 甲氟喹，7～10 周后产生最大稳定血药浓度是 1000～2000 μg/L。甲氟喹是高度亲脂性药物，广泛分布于全身，并可穿过血-脑脊液屏障。甲氟喹在肝脏代谢，通过胆汁和粪便排出。对肝肾衰竭患者调整用药剂量没有特别的建议。甲氟喹不可透析。

3)抗虫谱：甲氟喹对引起人体疟疾的所有疟原虫红内期裂殖体均有抗虫活性，已用于预防和治疗。每周服药 1 次足以预防疟疾，便于旅游者在疟疾流行区使用。虽然疟原虫对甲氟喹的耐药性已被认识，尤其是在东南亚的一些地区，但它在疟疾治疗中主要用于氯喹耐药的恶性疟原虫。它应与另一种药物，通常是青蒿素衍生物，联合治疗。甲氟喹不能杀死疟原虫裂殖体，所以感染间日疟患者随后应使用 8-氨基喹啉治疗。该药物对配子体也没有影响。

4)不良反应：甲氟喹的不良反应包括恶心和呕吐、粒细胞缺乏症、再生障碍性贫血及中枢神经系统的影响，如烦躁、头晕、失眠、噩梦和共济失调。胃肠道副作用呈剂量依赖性[125]。严重的神经精神反应包括谵妄和癫痫偶有报道，急性恶性疟患者治疗时的发生率为 1∶1300～1∶200[125-127]。甲氟喹也可作用于 β 受体阻滞药，加重心律失常。甲氟喹应避免用于有神经精神疾病（包括癫痫）病史的患者[128]。高剂量甲氟喹对动物有致畸作用，但人体尚未有致畸的报道（妊娠目录 B 类）[129-130]。服用甲氟喹可能增加自然流产率，因此，尽可能避免早孕期服药。有限的数据表明，即使早孕期使用也是安全的，如果服药的益处超过潜在的风险，它可用于妊娠后期[130-131]。甲氟喹在母乳中有少量的分泌，但必要时可用于哺乳期妇女的治疗。

(2)卤泛曲林：卤泛曲林是一个合成的菲甲醇化合物，尚未被 FDA 批准[1]，由于其潜在的心脏副作用，使用适应证有限。

1)作用机制：卤泛曲林对疟原虫无性红内期

有杀灭作用，但其确切的作用机制还不清楚。

2)药代动力学：卤泛曲林只可口服，但生物利用度多变。同脂肪类食物一起服用，则增强吸收，但因为高血药浓度会增强其毒性，故建议空腹给药。有报道，在口服3次(0、6、12 h)500 mg剂量的盐酸卤泛曲林后，血药浓度峰值可达到896 μg/L[132]。卤泛曲林在肝代谢，产生活性代谢产物N-去丁基氯氟菲醇。卤泛曲林的半衰期6～10天，其代谢产物的半衰期3～4天，主要从粪便中排出。

3)抗虫谱：卤泛曲林对间日疟原虫和恶性疟原虫治疗有效，但有关卵形疟原虫和三日疟原虫的治疗资料较少[133]。由于其毒性，不建议用于疟疾预防。它只能杀灭红内期裂殖体，对子孢子、配子体或组织阶段的虫体无杀灭作用。卤泛曲林比甲氟喹更有活性，但这2种药物之间存在交叉抗药性。卤泛曲林的费用和潜在的毒性也限制了它的使用。

4)不良反应：卤泛曲林导致的胃肠道不良反应，包括恶心、呕吐、腹泻和腹痛。它也具有潜在的心血管毒性，引起QT间期浓度依赖性延长。由于其可致心搏骤停[134]，患有长QT综合征者忌用。它还可致皮肤瘙痒和肝酶升高。孕妇忌用，母乳中排泄量未知，不建议哺乳期妇女使用。

(3)本芴醇：本芴醇(lumefantrine)是一种与卤泛曲林具有相似结构的药物。它作为一种长效的青蒿素配伍用药，以固定剂量组合广泛用于疟疾的治疗。

1)作用机制：本芴醇发挥抗疟作用的确切机制还不清楚，可能是与血红素结合形成复合体抑制β-血红素的形成，以及抑制核酸与蛋白质的合成有关。

2)药代动力学：口服本芴醇的生物利用度变化较大，与高脂膳食一起服用时，其生物利用率可增加3～4倍。血药浓度在6～8 h后达到峰值。本芴醇的蛋白结合率达99.7%，半衰期3～6天，具高亲脂性，分布广，其血浆峰浓度变化相当大，但据报道，在服用6片含2780 mg本芴醇后，其血药浓度中位数为8～9 μg/ml[135]。本芴醇主要在肝内代谢，血浆中主要代谢产物是去丁基-本芴醇。严重肾或肝衰竭患者应谨慎使用。

3)抗虫谱：本芴醇与蒿甲醚以固定剂量组合联合治疗，对所有疟原虫均有效。

4)不良反应：本芴醇的耐受性良好，有罕见的轻度不良反应如腹泻、恶心、腹痛和呕吐。没有证据显示心脏毒性与本芴醇的使用有关，但建议QT间期延长患者避免使用。青蒿素-本芴醇已被FDA指定为妊娠目录C类药。目前没有人的资料表明本芴醇经乳汁排泄，但动物实验数据表明部分本芴醇经乳汁排泄。本芴醇对婴儿的影响不清楚，哺乳期妇女应谨慎使用。

4. 8-氨基喹啉 8-氨基喹啉包括伯氨喹和他非诺喹(WR-238605)，他非诺喹尚未上市，也未获FDA批准[1]。

(1)作用机制：8-氨基喹啉干扰虫体内参与能量产生的线粒体酶，也对DNA有抑制作用，确切的作用机制尚不清楚[13]。该药的活性代谢产物阻止疟原虫休眠体线粒体的运输系统和嘧啶的合成[136]。

(2)药代动力学：8-氨基喹啉口服后吸收良好，生物利用率>90%。伯氨喹在肝迅速代谢，半衰期4～9 h，所以需每天服药。单剂口服45 mg，2～3 h后平均血药浓度峰值达到153.3 μg/L[137]。在身体大多数部位药物浓度相对较低。他非诺喹具有更长的半衰期2～4周，每周或每月一次服药足以预防，比伯氨喹的耐受性更好[138]。他非诺喹单次服药足以预防间日疟复发[139]，最佳剂量正在研究中。

(3)抗虫谱：伯氨喹对红内期疟原虫作用不及其他大多数抗疟药，但对所有疟原虫红前期的子孢子和组织内红外期裂殖体效果非常好。主要是防止氯喹治疗后由隐匿性休眠子引起的间日疟和卵形疟复发。此外，它可以杀死疟原虫尤其是恶性疟原虫配子体，阻断疟疾传播；它也是一种有效的疟疾预防用药，但传统上这种方式很少用于旅行者。他非诺喹比伯氨喹有更高的活性，对裂殖体的作用也更强[140]。

(4)不良反应：服用8-氨基喹啉后有轻度的胃肠道不良反应，常见的不良反应包括恶心和腹痛。该药可以引起溶血，不能用于6-磷酸葡萄糖脱氢酶缺乏患者。NADH高铁血红蛋白还原酶缺乏患者服用后有发生高铁血红蛋白血症的风险。伯氨喹偶尔也会导致心律失常、视觉调节失常。这些药物也不应该在妊娠或哺乳期使用，因为对胎儿有潜在的溶血风险。

(二)青蒿素衍生物

青蒿素(artemisinin)是中草药黄花蒿提取物。

是一种倍半萜内酯过氧化物。合成的衍生物包括蒿甲醚(artemether)、双氢青蒿素(dihydroartemisinin)、蒿乙醚(arteether),青蒿琥酯(artesunate)。虽然未获美国FDA批准,但青蒿素静脉制剂可以通过美国CDC签署研究性新药协议(Investigational New Drug program)获得并用于重症疟疾患者。

1. 作用机制 青蒿素及其衍生物主要作用于疟原虫无性红内期。它们能有效抗疟原虫,尤其是对早期环状体,使之清除并阻止更多成熟致病虫体的发育。青蒿素及其衍生物可与寄生虫膜和铁原卟啉Ⅸ结合,因此其可浓集于寄生虫,受染红细胞比未感染红细胞内的药物浓度高100～300倍[141]。与疟色素中的铁结合,诱导毒性氧自由基产生,从而损伤疟原虫细胞器,并使其蛋白烷基化,抑制虫体蛋白质合成,最终导致虫体死亡。

2. 药代动力学 青蒿素的衍生物比青蒿素具有更大的溶解度,因此开发了易于应用的、以多种途径给药的衍生物。青蒿琥酯是水溶性的,可静脉注射、肌内注射、口服或栓剂给药。蒿甲醚和蒿乙醚为脂溶性,有片剂、胶囊和肌内注射用等剂型。虽然体外试验显示青蒿琥酯最有效,但不同配方制剂的疗效无明显临床差异。青蒿素衍生物半衰期短,1～2 h,通常为每天给药1次,至少3天,均被代谢为活性化合物双氢青蒿素。健康志愿者单剂量口服双氢青蒿素2 mg/kg(译者注:按照文中参考文献[142],此处应为2 mg/kg和4 mg/kg),观察血药浓度中位数峰值分别是181 μg/L和360 μg/L[142]。细胞色素P450抑制剂,如柚子汁,可增加血中蒿甲醚水平。青蒿素被葡萄糖醛酸代谢为无活性产物而清除[4,143]。青蒿琥酯的药代动力学可能会由于妊娠和急性疟疾感染而改变。肝或肾损害的患者,应谨慎使用青蒿素衍生物。

3. 抗虫谱 青蒿素衍生物是抗恶性疟原虫和间日疟原虫最有效和快速作用的杀虫药,它们特异性地作用于疟原虫红内期。这类衍生物对多重耐药的恶性疟原虫有效,是甲氟喹和奎宁耐药的恶性疟原虫和氯喹耐药的间日疟原虫的首选药物。青蒿素衍生物对配子体也有效,配子体携带率可降低约90%,在其被广泛使用的地区阻断疟疾的传播[144-146]。它们对间日疟原虫和卵形疟原虫肝内休眠体期无效。晚期复发很常见,除非它们与另一种药物联合使用,因此应该联合第二种药物,如甲氟喹或强力霉素,或以固定的组合方式使用,如复方蒿甲醚/本芴醇、青蒿琥酯/阿莫地喹、双氢青蒿素/哌喹(Piperaquine)。青蒿素衍生物可快速清除寄生虫血症,最近的一项与奎宁对比的随机试验显示,对患重症恶性疟的成年患者使用青蒿素衍生物治疗有利于减少病死率[147-149]。然而,青蒿素耐药的恶性疟原虫也已出现,特别是沿泰柬边境,临床表现为寄生虫清除明显延迟[150]。尽管数据较少,口服青蒿素衍生物的复方制剂似乎对诺氏疟原虫[151]、卵形疟原虫和三日疟原虫的感染有效。静脉注射青蒿琥酯用于治疗诺氏疟原虫引起的严重感染[152]。青蒿素衍生物也有抗吸虫作用,在血吸虫病方面进行了一些研究,虽然不及吡喹酮有效,但可在将来作为联合治疗药的一部分发挥作用[153-155]。

4. 不良反应 青蒿素衍生物的耐受性很好,无严重的不良反应,尽管有抑制造血功能的报道。动物实验显示对神经系统造成不良反应,但还没有证据证明人身上出现此不良反应。啮齿类动物研究中发现致胎鼠死亡及先天畸形现象,在1837例孕妇(其中妊娠早期176例)接受青蒿素或以青蒿素为基础的复合制剂治疗的临床试验中未观察到此现象[156-157]。由于安全资料不足,一般建议避免在妊娠期间使用,但如果其益处大于风险,则可以使用,尤其是早孕期后。WHO建议静脉使用青蒿琥酯治疗妊娠期严重疟疾[111]。母乳中的药物排泄量未知。

(三)叶酸拮抗药(antifolates)

乙胺嘧啶-磺胺多辛(pyrimethamine-sulfadoxine)又名"法西达",尽管已产生广泛的耐药性,但在某些国家仍用于疟疾的治疗。乙胺嘧啶是合成的氨基嘧啶类抗疟药,磺胺多辛是一种长效磺胺类药物。

1. 作用机制 乙胺嘧啶通过抑制二氢叶酸还原酶来抑制红内期无性期疟原虫。虽然它对恶性疟原虫有效,但耐药性的迅速发展,成为限制其使用的一个主要因素。乙胺嘧啶与磺胺类或砜联合,对叶酸生物合成途径有连续、协同抑制作用。疟原虫无法利用宿主来源的叶酸,所以抑制叶酸生物合成从而阻止疟原虫DNA复制,最终导致疟原虫死亡。

2. 药代动力学 法西达片由 25 mg 乙胺嘧啶和 500 mg 磺胺多辛组成，这两种药物都能较好地口服吸收。口服 1 片后，乙胺嘧啶和磺胺的血药峰浓度分别为 0.13～0.4 mg/L 和 51～76 mg/L。乙胺嘧啶的半衰期是 80～95 h，磺胺多辛的半衰期是 150～200 h[120]。两者都有近 90%与蛋白质结合。磺胺多辛在肝中代谢，两者主要在尿中排出。

3. 抗虫谱 乙胺嘧啶-磺胺多辛对治疗与预防恶性疟均有效。由于潜在的严重不良反应，不再推荐用于常规的预防治疗。它主要作用于红内期裂殖体，但对配子体无杀灭活性。乙胺嘧啶-磺胺多辛也对间日疟原虫感染有一定疗效，但它比氯喹有更长的寄生虫清除和退热时间，并且失败率更高（30%～40%），因此不再推荐使用。乙胺嘧啶-磺胺多辛对三日疟原虫和卵形疟原虫作用尚未进行充分的评价。乙胺嘧啶与磺胺嘧啶联合也用于治疗弓形虫病。

4. 不良反应 乙胺嘧啶-磺胺多辛可引起不良反应，包括皮疹、恶心、呕吐、头痛和周围神经炎，也可导致更严重的偶尔发生的致死性反应，包括史蒂文斯-约翰逊综合征（Stevens-Johnson syndrome）和血液恶病质（特别是粒细胞缺乏症和巨幼红细胞性贫血）[117]。其他报道的不良反应包括肝炎、中毒性肾病、剥脱性皮炎和多形性红斑。磺胺类成分的半衰期长，意味着即使停药后，过敏反应仍可以持续较长时间。

乙胺嘧啶与动物致畸作用有关。尚未有人类的相关研究，但该药物常用于妊娠期，并有良好的胎儿预后。世界卫生组织现在建议生活在疟疾流行的非洲地区妇女，第一次和第二次妊娠的中晚期，接受乙胺嘧啶-磺胺多辛间歇性预防治疗[111]。在其他情况下，只有当潜在的益处超过对胎儿可能的风险时，才正式推荐在怀孕期间使用。法西达可引起婴儿核黄疸，所以孕晚期应该慎用。乙胺嘧啶和磺胺多辛均被分泌到乳汁中，最好避免在哺乳期服用。

（四）阿托伐醌-氯胍（马拉龙）（atovaquone-proguanil）

马拉龙（malarone）是由 250 mg 阿托伐醌（atovaquone）和 100 mg 氯胍（proguanil）制成的复方制剂。阿托伐醌是一种羟基萘醌，氯胍是一种抗叶酸药物。马拉龙已被美国 FDA 批准用于疟疾的预防和治疗。

1. 作用机制 疟原虫依赖嘧啶核苷酸从头合成途径，选择性地与电子传递耦合。阿托伐醌抑制寄生虫线粒体电子传递系统，从而阻断核酸的生物合成，抑制复制[158]。当作为单药治疗时，阿托伐醌与复发率高有关。氯胍也通过选择性抑制疟原虫二氢叶酸还原酶杀灭疟原虫红内期无性体。然而与阿托伐醌联合后，它可通过一种不同的机制，直接降低其有效浓度，此浓度下阿托伐醌引起线粒体膜电位崩溃[159]。

2. 药代动力学 阿托伐醌是水溶性差的高亲脂性化合物，口服生物利用率差且变化大。如果与脂类食品或乳饮料同时服用，其吸收会增加。它不被代谢，几乎完全从粪便排泄。血浆蛋白结合率 99%，半衰期 2～4 天。阿托伐醌的水平在不同个体间变化很大[160]。氯胍口服给药后迅速吸收。它在肝脏被细胞色素 P450 代谢成活性环嗪代谢产物环氯胍。血浆蛋白结合率 75%，主要随尿排出，半衰期 12～21 h。马拉龙每天 2 次，每次 2 片，服药 3 天后，氯胍平均血药浓度达 170 μg/L。阿托伐醌-氯胍的药代动力学在妊娠时发生改变。轻度至中度肝或肾功能不全时，无需调整用药剂量。然而，重度肾损害（肌酐清除率<30 ml/min）是禁用阿托伐醌-氯胍预防疟疾的，除非其治疗益处大于风险。

3. 抗虫谱 阿托伐醌-氯胍对恶性疟原虫的无性体或有性体均有效，推荐用于治疗和预防恶性疟，是疟疾流行区旅行者常使用的化学预防药物。阿托伐醌-氯胍也能有效的抗间日疟原虫和卵形疟原虫感染，但这 2 种药物都不能有效杀灭休眠子，所以停药后还需要另外服用伯氨喹防止疟疾复发。阿托伐醌-氯胍也对三日疟原虫和诺氏疟原虫有较好的疗效[152,161]。越来越多的报道指出，阿托伐醌-氯胍治疗恶性疟的临床失败及耐药性来自于细胞色素 β 基因的点突变。

4. 不良反应 阿托伐醌-氯胍通常耐受性很好。不良反应轻微，包括厌食、恶心、呕吐、腹痛、腹泻、皮肤瘙痒和头痛。5%～10%服药者出现短暂的、无症状的转氨酶和淀粉酶升高。由于安全性资料不足，所以不建议在妊娠期间（妊娠目录 C 类）或哺乳期用作预防药，也不建议在妊娠期间用作治疗药，但如果有安全保证时，可考虑使用。体重低于 5 kg 儿童用药安全性未知。

四、其他抗原虫药物

(一)安特酰胺糠酸酯

安特酰胺糠酸酯(diloxanide furoate)又名糠酯酰胺,是一种取代乙酰苯胺。它的主要用途是杀伤肠腔阿米巴。在美国,安特酰胺糠酸酯并未广泛使用,只能从特定药房获得[1]。

1. 作用机制 安特酰胺糠酸酯的作用机制未知。

2. 药代动力学 安特酰胺糠酸酯是以片剂形式服用。口服后,原形药物很难吸收,但可在肠腔内水解为一种活跃的化学物质二氯尼特。二氯尼特 90%以上可被吸收,在肝中发生葡萄糖醛酸化,1~2 h 在血清中达到峰值。其代谢物主要从尿排出。

3. 抗虫谱 安特酰胺糠酸酯主要作为一种肠内药物,可清除肠道溶组织内阿米巴包囊,因此可以防止包囊携带者的复发[162-163]。它对肠壁或其他组织如肝内的阿米巴无效,所以它通常与 5-硝基咪唑同时服用。

4. 不良反应 不良反应一般不严重,但包括皮疹、恶心、腹痛、腹泻和肠胃胀气。不推荐孕妇和哺乳期妇女使用。

(二)双碘喹啉

双碘喹啉(iodoquinol)是一种卤代 8-羟基喹啉衍生物,即双碘羟基喹啉。

1. 作用机制 双碘喹啉可使寄生虫的基本酶失活,并抑制寄生虫繁殖[13]。

2. 药代动力学 双碘喹啉口服给药,但吸收非常缓慢,不足 8%的药物吸收到体循环,因此主要由粪便排出。少量被吸收的药物在肝中被葡萄糖醛酸化,且少量的葡萄糖醛酸代谢产物从尿排出体外。肝肾功能不全的患者禁止使用,甲状腺疾病和神经疾病患者慎用。

3. 抗虫谱 双碘喹啉是一种有效的抗阿米巴药物。可有效杀死寄生于肠腔内的溶组织内阿米巴滋养体和包囊,并被用于清除阿米巴包囊,以防止复发[162]。因为其全身吸收不良,所以它对于侵袭性肠内和肠道外溶组织内阿米巴感染无效,常与 5-硝基咪唑联合使用。

双碘喹啉也能有效抑制结肠小袋纤毛虫(*Neobalantidium coli*)、脆弱双核阿米巴(*Dientamoeba fragilis*)和十二指肠贾第鞭毛虫(*G. duodenalis*)。

4. 不良反应 双碘喹啉的主要不良反应包括恶心、腹部绞痛、腹泻、头痛、瘙痒和皮疹。服药后皮肤和毛发可能暂时黄染。大剂量或长时间服用可导致视神经炎、视神经萎缩、周围神经病变、共济失调和癫痫。该药也与肾中毒有关。碘过敏者禁用。孕妇和哺乳期妇女用药安全性未知,所以建议避免使用该药。

(三)五价锑化合物(pentavalent antimonial compounds)

五价锑的衍生物可以用于治疗利什曼病。五价锑化合物包括葡萄糖酸锑钠(sodium antimonylgluconate 或 stibogluconate),也称作斯锑黑克,以及葡甲胺锑酸盐(N-methylglucamine antimoniate 或 meglumine antimoniate),亦称作锑酸葡胺(glucantime)。选择药物的标准主要基于成本和实用性。在美国,禁止使用这 2 种药物,但是患者可通过美国 CDC 获得葡萄糖酸锑钠[1]。

1. 作用机制 五价锑衍生物的确切作用机制不明,认为是锑剂抑制寄生虫糖酵解的酶。因为糖酵解是寄生虫 ATP 的主要来源,阻断该能量来源导致寄生虫死亡[13]。

2. 药代动力学 五价锑剂需肠外给药(肌内注射或静脉注射)或腹腔注射。新剂型和新的给药方法正在研究。该药物存在于血浆,主要经肾排出。少量药物可在肝中转化为三价锑,导致一定的不良反应。据报道,肌内注射初始剂量 10 mg/kg,2 h 后锑剂血药浓度的峰值达 9~12 mg/L[164]。对于肾功能不全患者,无明确药物剂量调整指南。

3. 抗虫谱 锑剂可有效杀死许多原虫和蠕虫,但因为其毒性,不再被推荐用于大多数寄生虫感染。尽管耐药性在增加,但因几乎没有替代药物,锑剂仍用于治疗内脏利什曼病、黏膜利什曼病和皮肤利什曼病。可用不同的治疗方案,常为 28 天疗法,但是具体的时间和疗效还要依据利什曼原虫的种类、疾病的严重程度和流行区域而定。

4. 不良反应 五价锑剂的不良反应常较轻,包括恶心、呕吐、头痛和精神萎靡,也可能出现更严重的不良反应,例如白细胞减少症、粒细胞缺乏症和心电图变化(QT 间期延长和室性心律失常)。

也有报道称会出现肾功能不全、蛋白尿和肝、胰酶升高。病变部位用药可出现局部超敏反应、红斑和水肿[166]。

(四)米替福新

米替福新(miltefosine)是一种磷酸胆碱类似物,最初作为抗癌药物。该药是第一种有效治疗内脏利什曼原虫的口服药物,随着利什曼原虫对五价锑的耐药性逐渐增加,米替福新变得更加重要。2014 年,米替福新获得 FDA 批准,作为口服药物治疗 12 岁及以上患者杜氏利什曼原虫引起的内脏利什曼病,巴西利士曼原虫、圭亚那利什曼原虫和巴拿马利什曼原虫引起的皮肤利什曼病,巴西利士曼原虫引起的黏膜利什曼病[167]。体外试验中米替福新也可杀死独立生存的福氏耐格里阿米巴(*Naegleria fowleri*),成功治疗了巴氏阿米巴(*Balamuthia*)和播散性棘阿米巴感染患者。

1. 作用机制　米替福新的作用机制还不完全清楚。该药可干扰细胞信号通路,可能作用于寄生虫细胞表面的醚脂代谢的关键酶[168-169]。米替福新似乎没有直接的免疫刺激作用,但是它可诱导细胞凋亡[170-171]。体内和体外均可有效杀灭寄生于细胞内的利什曼原虫无鞭毛体和细胞外的前鞭毛体[172]。

2. 药代动力学　口服米替福新后,吸收良好、分布广泛。人体内的药代动力学数据很少,但在大鼠体内,该药被迅速吸收,并在肾、肝、肺、脾和肾上腺积聚[169]。米替福新每次口服 30 mg/kg,一天 2 次,组织内药物浓度可达 155～189 nmol/g[168]。米替福新半衰期长达 8 天,在磷脂酶作用下缓慢代谢。

3. 抗虫谱　米替福新可有效杀灭体内外的利什曼原虫和克氏锥虫(*Trypanosoma cruzi*),但是目前的临床研究仅限于利什曼原虫。体外实验已经证明米替福新可有效杀灭布氏锥虫、溶组织内阿米巴和棘阿米巴[173]。内脏利什曼病的临床试验中,米替福新对于成人和儿童 6 个月治愈率达 90%以上,尽管已经出现的耐药性正在降低它的有效性[174-175]。在不同的地区使用不同的米替福新组合治疗方案。近期研究报道了该药对新大陆皮肤利什曼病的疗效,表明该药对大多数种类的利什曼原虫有效性达 70%～90%[176]。它也用于黑热病后皮肤利什曼病(post-kala azar dermal leishmaniasis)的治疗。近期报道有米替福新联合其他药物治疗肉芽肿性阿米巴脑炎的成功案例[177-178]。

4. 不良反应　在不同的临床试验中,尽管米替福新的治疗窗口期似乎很窄,其不良反应通常是可以耐受和可逆的[170]。高达 60%的患者可发生轻至中度的胃肠道不良反应,包括恶心、呕吐和腹泻。也有多达 40%患者可发生剂量相关的眩晕症[179]。据报道,天冬氨酸转氨酶、肌酐和(或)血尿素氮水平轻度增加,某些病例伴随可逆性随肝中毒和肾损伤[169,174]。据报道,已有继发于米替福新治疗后的致死性急性胰腺炎病例报道[180]。米替福新可使实验动物流产和致畸,因此孕妇和哺乳期妇女禁用[181]。育龄期妇女治疗期间及治疗后 3～5 个月内应避孕[167,181]。

(五)喷他脒

喷他脒(pentamidine)是芳香双脒类化合物,是治疗利什曼原虫病和非洲锥虫病的抗原虫药。它已经得到美国 FDA 批准[1]。

1. 作用机制　喷他脒在化学作用上与胍相关。它的作用机制还不清楚,对于不同的病原体的作用机制可能不同,可能是抑制原生生物二氢叶酸还原酶,并干扰有氧糖酵解,也可能是干扰氨基酸转运、沉淀核苷酸及含核苷酸的辅酶,抑制 DNA、RNA 和蛋白质合成[182]。

2. 药代动力学　喷他脒目前作为羟乙基磺酸盐使用,很难通过胃肠道吸收,因此用于抗原虫感染时必须肌内注射或静脉注射,但也可通过吸入防治耶氏肺孢子菌肺炎或局部注射治疗皮肤利什曼病[183]。据报道,静脉注射 4 mg/kg 后,血浆浓度可达 0.3～1.4 mg/L[184]。在肾、肝、脾中药物浓度达到最高,并且喷他脒很难穿透到中枢神经系统。因为该药可被组织大量快速吸收,因此血清中的半衰期短,6.5～9.0 h。但其与组织大量结合,导致它的排泄时间延长至 6～8 周,且药物以原形通过肾排泄。肝肾功能不全时应谨慎使用喷他脒,但是没有剂量调整建议。

3. 抗虫谱　喷他脒的抗寄生虫适应证包括利什曼病和非洲锥虫病,但是它的主要用途是作为治疗和预防耶氏肺孢子菌肺炎的抗菌药。尽管该药可有效抗利什曼原虫,但由于它的毒性,该药主要用于锑剂不耐受患者、其他治疗难以奏效者或

联合治疗。喷他脒可有效治疗非洲锥虫病，是疾病早期的一线药，但仅限没有出现中枢神经症状的锥虫病患者使用。由于罗德西亚布氏锥虫病中枢神经系统症状出现早，该药更常用于治疗冈比亚布氏锥虫感染。喷他脒有时也用于棘阿米巴和巴氏阿米巴（*Balamuthia*）引起的肉芽肿性阿米巴脑炎的联合治疗。

4. 不良反应 超过 1/2 的喷他脒治疗患者会出现不良反应，引起的各种相关不良反应似乎与血浆中药物浓度无关[182]。速发反应包括恶心、食欲缺乏、头晕、瘙痒和低血压。喷他脒也能引起局部反应，包括注射位置的疼痛和坏死。此外，喷他脒与一些血液反应有关，尤其是白细胞减少征（高达 10%的治疗者）和血小板减少症（约 5%治疗者），还可引起电解质紊乱，包括高钾血症、低镁血症和低钙血症。其他严重的不良反应包括室性心律失常、胰腺炎、低/高血糖症、肝中毒和急性肾衰竭。喷他脒也和 Stevens-Johnson 综合征有关。偶尔也引起痉挛和幻觉。关于妊娠期或哺乳期使用喷他脒的安全性数据很少，因此不建议使用。

（六）巴龙霉素

巴龙霉素（paromomycin）最初命名为氨苷菌素，是一种口服、吸收不良的广谱氨基糖苷类药物。它有效抵抗革兰阴性菌、很多革兰阳性菌和一些原生动物和绦虫，美国 FDA 批准它用于治疗非侵袭性肠道阿米巴病，有时作为隐孢子虫病、脆弱双核阿米巴原虫感染和贾第虫病的“标签外使用”（译者注：未在药品许可证所列适应证范围内）药物。巴龙霉素分为肌内注射药（内脏和皮肤利什曼病）、局部用药（旧大陆和新大陆皮肤利什曼病[185]）和口服药（原虫感染）。

1. 作用机制 巴龙霉素是一种蛋白合成抑制药，与 16SrRNA 结合发挥作用，从而抑制蛋白合成。然而，当用于利什曼病治疗时，它有另外的作用机制，虽然机制不完全清楚，但可能涉及抑制寄生虫代谢和线粒体呼吸[186]。

2. 药代动力学 巴龙霉素口服后不被吸收，未经代谢即从粪便排出。肌内注射后 0.5～1.5 h 内血药浓度达峰值，半衰期 2～3 h。与血浆蛋白结合量少，可忽略。以 12～15 mg/kg 剂量用药 1 h 后，血浆药物浓度平均值达 18.3～20.5 μg/ml。巴龙霉素肠道外给药广泛分布于体内，在骨、滑膜液和腹腔液中浓度可测量，但中枢神经系统的渗透作用可忽略不计。肾功能不全患者应谨慎使用。

3. 抗虫谱 口服巴龙霉素可有效治疗十二指肠贾第鞭毛虫、隐孢子虫和脆弱双核阿米巴等肠道原虫。因其安全性，是孕妇贾第虫病首选药物，也可用于其他药物无效的情况[187]。此外，它还可清除肠道溶组织内阿米巴感染，但对肠外阿米巴无效。它还用于治疗人芽囊原虫感染[188]，对阴道毛滴虫也有效。也可肠外或局部给药治疗皮肤和内脏利什曼病，有时需联合其他药物。尽管它对大多数的绦虫感染有效，但由于有其他替代药物而不用于此适应证[189-190]。

4. 不良反应 巴龙霉素最常见的不良反应包括恶心、胃肠蠕动增加、腹痛和腹泻。与其他的氨基糖苷类抗生素一样，肌内注射巴龙霉素全身吸收，可能引起可逆性耳毒性和肾毒性。它还可引起肝转氨酶的增高。肠道外给药时，约 50%患者发生注射部位轻微疼痛。

因为口服巴龙霉素不被吸收，对胎儿和婴儿无不良影响，所以在妊娠期和哺乳期可以使用。然而，注射的氨基糖苷类药物可通过胎盘，且可能在胎儿血浆和羊水中聚集。在动物实验中没有观察到生殖毒性，但也没有充分数据可支持孕妇使用巴龙霉素。当前数据均表明，母亲和婴儿肾功能正常时，哺乳期注射巴龙霉素是安全的[186]。

（七）苏拉明

苏拉明（suramin）是一种尿素聚磺酸萘胺（polysulfonated naphthylamine）衍生物。其主要适应证是治疗非洲锥虫病。在美国，它没有被批准使用，但可以通过签署用药协议从美国 CDC 获得该药[1]。

1. 作用机制 苏拉明的作用机制不是十分清楚，但认为它是通过抑制锥虫 DNA 代谢和蛋白合成相关的酶而发挥作用[191]。

2. 药代动力学 苏拉明是一种钠盐，可溶于水。口服后不能吸收，常以 10%溶液缓慢地静脉给药。静脉注射后，快速分布，超过 99%的苏拉明和血浆蛋白结合。该药不能通过血-脑脊液屏障。它很少或无代谢，半衰期 41～78 天，随尿排出体外。肾功能不全或明显的肝功能缺陷患者不宜使

用该药。

3. 抗虫谱　苏拉明是冈比亚布氏锥虫感染血液淋巴早期的一种有效药。如果没有累及中枢神经系统，该药对罗德西亚布氏锥虫感染也有一定作用[192]。在没有伊维菌素前，苏拉明用于治疗盘尾丝虫病。苏拉明的优势是强效的杀微丝蚴作用，损害盘尾丝虫虫体肠上皮细胞，导致虫体死亡，但是在常规剂量内也会发生频繁的毒性反应[193]。苏拉明也可有效杀灭班氏丝虫成虫，但不建议用于此症[13]。

4. 不良反应　潜在的不良反应，如注射苏拉明后立即出现恶心、呕吐、休克和昏迷。其他不良反应包括肾损伤、剥脱性皮炎和神经毒性，还可引起全血细胞减少症。据报道苏拉明对啮齿类动物有致畸作用[194]。虽然没有人类胎儿畸形的报道，但是不推荐孕妇使用，除非没有合适的替代疗法。

(八)美拉胂醇

美拉胂醇(melarsoprol)是三价砷化合物，主要用于非洲锥虫病的治疗。在美国，它没有被批准使用，但可以通过签署用药协议从美国 CDC 获得该药[1]。

1. 作用机制　美拉胂醇可能和锥虫的巯基结合，与丙酮酸激酶活性部位有非常高的亲和力，影响寄生虫能量的产生，从而阻止滋养体增殖。

2. 药代动力学　口服美拉胂醇可吸收，但通常静脉给药。溶于丙二醇溶剂，缓慢静脉注射。低于 1%可穿透中枢神经系统，脑脊液中药物浓度比血清中低 50 倍[12,195]。尽管有耐药性报道，但它仍是治疗晚期锥虫病的有效药。美拉胂醇的半衰期约 35 h。代谢机制尚未研究清楚，但是它主要随尿排出。

3. 抗虫谱　美拉胂醇可有效治疗冈比亚布氏锥虫和罗德西亚布氏锥虫引起的各个阶段的非洲锥虫病，也是布氏罗德西亚锥虫感染晚期的唯一治疗用药。治疗周期已经从 1 个月减少到 10 天[196]。因为该药的不良反应，它通常用于治疗发生中枢神经系统症状的疾病晚期[197]。

4. 不良反应　美拉胂醇通常可引起明显的不良反应，包括呕吐、腹痛、肝中毒、周围神经病变、过敏反应、心肌炎、心律失常和蛋白尿。可导致高达 10%患者发生反应性脑病，也因此与高死亡率有关。过敏反应发生也较为频繁。注射给药有强烈的刺激作用，静脉注射过程中应避免药液外渗。还有少量潜在致畸作用数据报道。

(九)依氟鸟氨酸

依氟鸟氨酸(eflornithine)(又称二氟甲基鸟氨酸)的主要适应证是非洲锥虫病。药物供应受限，在美国不可全身使用。

1. 作用机制　依氟鸟氨酸可选择性地、不可逆地抑制鸟氨酸脱羧酶，该酶在寄生虫细胞增殖和分化过程是形成多胺所必需的。它是锥虫抑制剂而不是杀虫剂[197]。

2. 药代动力学　依氟鸟氨酸可口服，生物利用度大于 50%，但常导致严重腹泻，因此通常静脉给药。静脉给药后，不与蛋白质结合。它可穿过血-脑脊液屏障，脑脊液与血的比率是 0.13～0.5[198-199]。半衰期是 3.0～3.5 h，约 80%药物以原形由肾排出。明显肾功能不全患者应减量使用。

3. 抗虫谱　依氟鸟氨酸用于治疗有中枢神经系统症状的冈比亚布氏锥虫病。硝呋莫司-依氟鸟氨酸联合是中枢神经系统期冈比亚布氏锥虫感染的标准一线用药[196,200]。依氟鸟氨酸单药对冈比亚布氏锥虫病无效[201]。依氟鸟氨酸对其他寄生虫如疟原虫、隐孢子虫和阴道毛滴虫也有效，但因其毒性而不用于治疗这些寄生虫感染。

4. 不良反应　高达 40%患者对依氟鸟氨酸产生不良反应。常见的不良反应包括呕吐、腹痛、腹泻、眩晕、关节痛、听力丧失和皮疹。骨髓毒性导致贫血、血小板减少症和白细胞减少症也有报道。已证明依氟鸟氨酸可阻止动物胚胎发育[202]。妊娠和哺乳期(妊娠目录 C 类)用药安全性尚无很好的研究，因此只有当对孕妇益处大于对胎儿的可能危险时，才能使用该药。

(十)硝呋莫司和苄硝唑

硝呋莫司(nifurtimox)和苄硝唑(benznidazole)是用于治疗美洲锥虫病的两种药物。硝呋莫司是合成硝基呋喃类，苄硝唑是 2-甲硝唑类衍生物。苄硝唑于 2017 年 8 月被 FDA 批准用于 2～12 岁的恰加斯病儿童。硝呋莫司可通过美国 CDC 签署研究性新药协议获得[203]。截至 2018 年 5 月，苄硝唑不能通过 CDC 签署研究性新药协议获得，医生可以直接从 Exeltis 制药公司获得[67]。

1. 作用机制　苄硝唑对克氏锥虫细胞蛋白和

RNA合成有抑制作用[204]。该药可增加吞噬作用、细胞因子释放、产生反应性丝裂原中间产物从而破坏细胞内寄生虫[205]。

硝呋莫司是一种前体药物，由寄生虫编码硝基还原酶激活，产生对锥虫有毒的细胞毒性腈代谢物[206]，它还能通过破坏寄生虫DNA直接抑制蛋白质合成[207]。

2. 药代动力学 苄硝唑可口服给药，有90%以上的生物利用度，约40%与蛋白质结合，半衰期约12 h，组织穿透力强[208-209]。硝呋莫司可口服给药，但是生物利用度低。该药在肝代谢，半衰期约3 h。建议有明显肝、肾功能不全患者应降低剂量，但无明确的用药指南。

3. 抗虫谱 苄硝唑和硝呋莫司均可用于治疗克氏锥虫急性感染。在疾病晚期两药均证实无效，且治疗慢性感染的适应证仍有争议，但正在扩大[210-212]。还没有在成人中开展随机试验评估两者的相对安全性和有效性[213]。现在，硝呋莫司也越来越多地与依氟鸟氨酸联合用于一线治疗冈比亚布氏锥虫感染。该药对于利什曼病也有一定作用，但不常规使用。

4. 不良反应 苄硝唑的不良反应常见，高达40%，通常包括呕吐、腹痛、周围神经病变、皮疹和瘙痒。骨髓抑制和神经精神反应也有报道。硝呋莫司不良反应明显，很多患者不能完成疗程。其不良反应包括厌食、恶心、皮疹、头痛、睡眠障碍、周围神经病变和肌痛。不常见但是更严重的不良反应包括精神错乱和抽搐。苄硝唑可通过胎盘，但是对于动物或人致畸的资料很少[214]。硝呋莫司可在母乳中检测到，所以在哺乳期，应谨慎使用该药[215]。同样地，由于缺乏苄硝唑和哺乳期的安全数据，所以建议在哺乳期减量使用。

附录

国家和地区医药管理机构

此处列出的管理机构是国际药品管理机构联盟(International Coalition of Medicines Regulatory Authorities，ICMRA)的成员或准成员。可以通过ICMRA网站上的链接访问各个网站(http://www.icmra.info/drupal/participating-RegulatoryAuthorities)。

国家或地区	管理机构
澳大利亚	澳大利亚药品管理局(TGA)
奥地利	奥地利医药和医疗器械管理局(AGES MEA)
巴西	巴西国家卫生监督局(ANVISA)
加拿大	加拿大卫生部健康产品与食品分部(HPFB)
中国	中国食品药品监督管理总局(CFDA)
丹麦	丹麦药品管理局
欧洲地区	欧盟委员会——健康与消费者总局(DG-SANCO)和欧洲药品管理局(EMA)
法国	法国国家药品与健康产品安全局(ANSM)
德国	德国联邦血清与疫苗管理局(PEI)
印度	印度中央药物标准控制组织(CDSCO)
爱尔兰	爱尔兰保健品监管机构(HPRA)
意大利	意大利药品管理局(AIFA)
日本	药品和医疗器械管理局(PMDA)和卫生、劳工和福利部(MHLW)
韩国	食品和药品安全部(MFDS)
墨西哥	联邦卫生风险保护委员会(COFEPRIS)
荷兰	荷兰药物评价局(MEB)
新西兰	新西兰药品和医疗器械安全局
尼日利亚	国家食品药品管理局(NAFDAC)
波兰	波兰药品、医疗器械和生物制品注册总局(URPLWMiPB)

（续 表）

国家或地区	管理机构
俄罗斯	俄联邦居民健康与社会发展监督部(Roszdravnadzor)
新加坡	新加坡卫生科学局(HSA)
南非	卫生署药物管制委员会(MCC)
西班牙	西班牙药品和医疗器械管理局(AEMPS)
瑞典	瑞典药品管理局(MPA)
瑞士	瑞士联邦卫生部和药物监管局
英国	药物和保健产品监管局(MHRA)
美国	美国 FDA

参考文献请扫二维码查阅

第153章 抗寄生虫药物的耐药机制

W. EVAN SECOR，JACQUES LE BRAS，JÉRÔME CLAIN

（郭大文 译；苏建荣、陈家旭 审校）

寄生虫病是世界上流行最广和最严重的疾病之一。然而，由于无有效的抗寄生虫疫苗，且其他行之有效的控制措施在寄生虫病流行国家又难以实施，因而对寄生虫病的防治主要依赖于单一的工具：治疗或预防的药物。由于目前抗寄生虫产品的相对匮乏及寄生虫耐药性的自然选择，仅靠药物防控的危险更为严重，这一局面主要是由于缺乏对研究和开发的经济激励，而且，社区和防治项目中对可用药物的不合理使用，导致寄生虫耐药性的产生。

寄生虫与宿主（有时称媒介）间生物相互作用的复杂性显著影响耐药性的产生和呈现。很多情况下观察到的耐药现象是真正的耐药，主要由寄生虫的生物学特性决定，使得它们能够在同种敏感虫体致死药物浓度下依然存活。这种真正耐药的机制多种多样，包括减少虫体内药物的积累，改变酶结构或代谢途径等。然而，宿主的多种因素调节临床和寄生虫对药物治疗的反应，所观察到的反应不能反映真正的耐药性或敏感性。例如，寄生虫感染高发人群获得高免疫率，即使寄生虫对药物耐药或使用的药物效果很差，也足以清除感染。反之，如果宿主用药剂量不足、吸收不良，或缺乏抗寄生虫必须的与药物有协同作用的免疫应答，即使使用敏感的抗寄生虫药物，也不一定获得成功治疗。宿主因素在寄生虫流行地区可能尤为重要，这些地区由于寄生虫传播率高而在人群中产生高免疫率，或者反过来，营养不良或人类免疫缺陷病毒感染破坏了患者的免疫状态。

更深入地了解药物耐药的流行病学和机制，可以为更好地使用现有药物及研发新的药物提供有价值的指导。本章对5种寄生虫病耐药性进行回顾，以说明目前存在的问题及可能的解决方案。表153-1总结了可能的耐药机制。

表153-1 抗寄生虫药物耐药机制

疾病	药物	耐药机制
疟疾	氯喹	由于PfCRT和PfPGH-1基因突变改变了转运特性，降低了药物在虫体空泡内的积聚
	甲氟喹	空泡多药转运子PfPGH-1过表达，寄生虫对药物发生空泡隔离（vacuolar sequestration）作用
	乙胺嘧啶	由于相关基因突变引起寄生虫二氢叶酸还原酶与药物结合的亲和力改变
	磺胺多辛	由于相关基因突变引起寄生虫二氢蝶酸合成酶与药物结合的亲和力改变
	阿托伐醌	由于相关基因突变引起寄生虫细胞色素b与药物结合的亲和力改变
	青蒿素	kelch K13蛋白突变，确切机制了解甚少
	哌喹	空泡血红蛋白酶plasmepsin2和3表达增加，以及*PfCRT*基因突变改变了空泡转运特性（vacuolar transport）
滴虫病	甲硝唑、替硝唑	降低激活硝基必需的酶或辅酶的浓度减少氧的清除
利什曼病	五价锑剂	通过减少吸收、增加外排或降低向活性的三价形式的转化而降低细胞内药物浓度
	米替福新	某些地区替代五价锑作为首选治疗药物，通过增加药物外排或增强虫株感染性而耐药
	两性霉素B	增加药物外排，改变巯基代谢
非洲锥虫病	喷他脒（第一阶段）	摄取药物的P2-腺苷和（或）水甘油通道蛋白2转运蛋白突变或缺失

（续　表）

疾病	药物	耐药机制
	苏拉明(第一阶段)	在冈比亚布氏锥虫为主要感染病原的西非无用,因为盘尾丝虫病患者发生严重的过敏反应
	美拉胂醇	摄取药物的 P2-腺苷和(或)功能性水甘油通道蛋白 2 转运蛋白突变或缺失
	依氟鸟氨酸或依氟鸟氨酸联合硝呋替莫	罗得西亚布氏锥虫天然耐受,只对冈比亚布氏锥虫有效
血吸虫病	吡喹酮	广泛的临床耐药性还未被当作严重的公共卫生问题 在一些地区治疗遇到遗传瓶颈,耐药株在实验室中得到证实

一、疟疾

(一)概述

1955 年,WHO 制定了消灭疟疾(malaria)计划,通过室内喷洒杀虫剂以控制人与媒介按蚊的接触,以及大规模使用乙胺嘧啶和氯喹杀灭红内期的寄生虫[1]。这些项目面临着基础设施短缺及对杀虫剂产生耐药性等问题,媒介控制往往被忽视,大量费用用于治疗认定为疟疾的发热患者,初始治疗主要用氯喹,而后用磺胺多辛-乙胺嘧啶。然而,该计划对恶性疟原虫(*Plasmodium falciparum*)不起作用,这种最致命的疟原虫已经发展为对氯喹和磺胺多辛-乙胺嘧啶耐药,而且几乎对所有已知药物都有不同程度的耐药。全世界每年 2.12 亿罹患疟疾的人中,仅撒哈拉以南非洲地区就占 90%,疟疾导致每年 42.9 万人死亡[2]。重症疟疾主要影响那些获得性免疫力不足的人如幼童,或特殊人群如孕妇。自 21 世纪初,加强疟疾综合防控付出了巨大努力,降低了疟疾的发病率和死亡率[2]。消灭疟疾计划的关键要素包括长效杀虫蚊帐的广泛使用[3]和全球疟疾诊断试验的建立,以及随后采用的基于青蒿素联合疗法(artemisinin-based combination therapies,ACTs)。该方案联合一种长半衰期的治疗药物与一种能够在几个小时内消灭大量虫体的快速作用药物。青蒿素从主要生长在中国的黄花蒿中提取,它在虫体内产生氧化应激反应。多药联合可以提高治疗效果,延缓寄生虫获得性耐药的发生。与青蒿素衍生物联合使用的药物目前包括阿莫地喹、本芴醇、甲氟喹、哌喹、咯萘啶或磺胺多辛-乙胺嘧啶。如果 ACTs 的使用不加控制,氯喹和磺胺多辛出现耐药和传播的历史将成为 ACTs 失去疗效的风险警告。的确,21 世纪中期以来,ACTs 耐药性在东南亚出现并播散,以 ACTs 为基础的三联疗法目前正在这些地区进行临床试验。

4-氨基喹啉类药物氯喹自 20 世纪 40 年代以来以其低廉、安全和起效快等特点成为抗疟药物的基石。然而,随着对喹啉耐药的恶性疟原虫越来越多,并且在 20 世纪 80 年代达到高峰,氯喹已经失去了它绝大部分治疗效用。对氯喹的耐药性从东南亚、南美洲和巴布亚新几内亚局部原始疫区开始不可避免地蔓延开来,如今在流行区的大部分地区已发现,包括疟疾负担最为严重的非洲大陆。尽管在某些地区由于氯喹正式停止使用,其耐药水平有所下降,在恶性疟流行为主的国家,氯喹不再是快速有效的治疗(或预防)的恰当选择。磺胺多辛-乙胺嘧啶是继氯喹之后第二种最便宜的、相对安全和易于使用的药物,随着使用的增加,寄生虫对其耐药性迅速增加,与几年前氯喹的耐药传播途径相同。然而,流行地区的特定人群(如孕妇)仍依赖于磺胺多辛-乙胺嘧啶治疗发热或进行间断性预防治疗,作为阻断疟疾严重后果的最有效方式。专家认为失去这 2 个低成本抗疟药物(antimalarials)是公共卫生领域的灾难。降低疟疾传播强度能够减缓药物耐药性的蔓延,但矛盾的是,低于某个临界水平可能加速多基因耐药性的选择[3]。这一严峻的形势促使国际间采取主动行动应对高成本的 ACTs:在各地开展便宜的快速诊断试验,广泛使用杀虫剂浸渍的蚊帐改进蚊虫控制计划。从过去的经验可知,ACTs 耐药的检测和控制滞后可能会一度摧毁所有没有替代药物的计划,必须加强实施耐药性监测和药物开发。

(二)恶性疟原虫对某些抗疟药物的耐药机制

氯喹浓度从虫体外的纳摩尔水平升高到红细

胞内滋养体消化空泡(digestive vacuole)内的毫摩尔水平，在此处抑制血红蛋白降解[4]。氯喹与寄生虫降解宿主红细胞血红蛋白的产物血红素形成复合物，导致铁原卟啉Ⅸ大量积聚最终杀死虫体。耐药虫株均有氯喹在消化空泡里积聚不良的特征[5]。氯喹的积聚可能有多种机制，如pH梯度变化或膜通透性改变引起药物吸收减少或外排增多[6]。氯喹的积聚有高度结构特异性，提示消化空泡内有一种特异的转运蛋白/渗透酶或一个与血红素相关的分子参与其中[7]。发现维拉帕米能够逆转氯喹耐药性之后，早期的研究集中于哺乳动物同源性多重耐药(*mdr*)基因，其产物在癌细胞中过度表达，排出癌细胞中的细胞毒药物[8]。利用这种方法发现了 *pfmdr*1 基因，其编码产物是寄生虫消化空泡膜上的转运蛋白(PfPGH-1)[9]。在特定遗传背景下，PfPGH-1 特定氨基酸残基的突变改变了氯喹的敏感性[10]。然而，现有证据表明，*pfmdr*1 基因除了在马达加斯加氯喹治疗失败中起主要作用外，在氯喹耐药中其实扮演次要角色[11]。最近，利用氯喹敏感虫株和耐药虫株的基因交叉的遗传数据，获得了恶性疟原虫氯喹耐药转运基因 *pfcrt* 的重大发现[12-13]。*pfcrt* 基因编码跨膜蛋白 PfCRT，和 PfPGH-1 一样，定位于消化空泡的膜上[13]。大多数氯喹治疗失败的自然分离虫株及体外氯喹耐药表型的虫株均发现 *pfcrt* 基因一系列复杂的突变(和单倍型)[13-15]。最后，用氯喹耐药株中发现的突变 *pfcrt* 基因转染氯喹敏感株足以产生氯喹耐药[16]。突变的 PfCRT 获得了将氯喹排出消化空泡的能力[17]，这依赖于转运蛋白第一个跨膜螺旋处 76 密码子(通常是 K76T 的突变)正电荷的丢失[17-18]。伴有 K76T 的其他 *pfcrt* 基因突变的作用仍不清楚[6]。至少发现了分布在不同地域的四种独立的携带 K76T 突变的 *pfcrt* 突变单倍型：亚洲-非洲和巴布亚各 1 个，南美洲 2 个[15]。氯喹耐药机制研究的又一重大事件发生在 20 世纪 50 年代，在泰国-柬埔寨边境，药物压力选择下出现了 *pfcrt* 基因的 72-76 密码子 CVIET 单倍型，该单倍型如今在亚洲和非洲地区蔓延[15,19]。然而，野生型 *pfcrt* 疟原虫并未完全被取代，当药物压力解除，野生株流行性增加[20]。在法属圭亚那，由于南美常见的 *pfcrt* 突变体单倍型获得一个额外的突变，氯喹耐药性发生逆转，这可能是由于同时获得了 *pfcrt* 介导的哌喹耐药性所致[21]。除了法属圭亚那的具体案例，*pfcrt* K76T 突变目前是一个用于氯喹耐药流行病学调查的有价值的分子标志物。据其估算流行性可预测某地氯喹临床疗效，如果适当调整宿主因素尤其是免疫力，即使用无效药物治疗也会将疟原虫清除[22]。

阿莫地喹、哌喹和咯萘啶是与青蒿素配伍治疗疟疾的一线药物，它们与氯喹有一个相同的喹啉结构，而 ACTs 的其他配伍用药甲氟喹和本芴醇则属于氨基醇类。这些药物的作用机制和耐药机制都不如对氯喹了解的清楚。然而，*pfmdr*1 基因可能参与寄生虫对多种抗疟药物治疗的应答，由于基因点突变或扩增改变了寄生虫对阿莫地喹的活性代谢产物去乙基阿莫地喹、奎宁、甲氟喹、本芴醇和青蒿素的敏感性[10,23-26]。同样，除了氯喹以外，野生型和各种 *pfcrt* 等位基因突变还与其他各种抗疟药物(本芴醇、阿莫地喹、哌喹、青蒿素变异体)的敏感性改变有关[6,16,27]。PfCRT 和 PfPGH-1 以外的转运蛋白如 PfMRP-1 和 PfNHE-1 可能分别参与了甲氟喹、本芴醇、乙胺嘧啶[28-29]和奎宁耐药性发生。编码空泡蛋白酶的 *plasmepsin* 基因 2 和 3 的扩增和特异性 *pfcrt* 基因突变与哌喹的耐药性相关[30-33]，提示空泡是哌喹作用的靶点。

恶性疟原虫对青蒿素的耐药最早于 21 世纪中期出现在柬埔寨[33]，随后播散至东南亚多个地区。表现为起始治疗后寄生虫清除时间延迟，以及青蒿素治疗失败率增高[34-36]。大量遗传学研究表明寄生虫基因组某些特定区域与体内寄生虫清除延迟有关[37-38]。对实验室筛选的和柬埔寨现场来源的青蒿素耐药虫株的比较基因组学发现，K13 蛋白的 kelch 结构域单个氨基酸改变是青蒿素耐药的遗传标记[39]。青蒿素敏感虫株的基因编辑证实耐药虫株 *k*13 基因诱导突变足以导致对青蒿素耐药[40]。携带 *k*13 突变的虫体表现为红内期早期细胞发育延缓和蛋白质稳态应答改变[41-42]。在生物化学水平，显性 *k*13 C580Y 突变改变了 K13 与虫体磷脂酰肌醇-3-激酶的结合，泛素介导的降解随之下降[43]。青蒿素耐药与磷脂酰肌醇-3-激酶相关的代谢路径之间的功能关系目前还不了解。多个 *k*13 耐药突变在青蒿素耐药最早被发现时就出现了，而一个 *k*13 C580Y 点突变寄生虫谱系现在在整个东泰国-柬埔寨-老挝人民民主共和国-越

南地区播散，可能是由于相关的配伍药物发生耐药，以及虫体有了更好的适应性[44-45]。

对拮抗单一酶的药物如叶酸拮抗剂（antifolates）或抑制线粒体呼吸链的药物，一个单基因的修饰通常足以产生高水平的耐药性。疟原虫大多依赖从头合成来获得叶酸，环氯胍（由前体药氯胍生成）及其类似物乙胺嘧啶是 20 世纪 40 年代问世的第一代令人满意的拮抗叶酸的合成抗疟药物。两种药物均抑制疟原虫叶酸合成的关键酶二氢叶酸还原酶（plasmodial dihydrofolate reductase，PfDHFR）。遗憾的是，在这些药物被引入的地区，几乎立刻独立发生耐药，并很快被氯喹取代[46]。PfDHFR 抑制药物的重新启用发生在 1967 年，证实与砜/磺胺组中其他拮抗叶酸的药物（如磺胺多辛或氨苯砜）协同可以避免耐药，因而磺胺多辛-乙胺嘧啶成为应对东南亚地区氯喹耐药的新先锋[46]。然而，磺胺多辛-乙胺嘧啶在泰国增加使用后不久其耐药性就出现了。对 PfDHFR 抑制药物耐药是由 PfDHFR 酶突变所致，抗叶酸药物与其结合力不如野生型高[47-48]。恶性疟原虫对乙胺嘧啶及随后磺胺多辛-乙胺嘧啶耐药性的逐步获得是由逐步突变所致：首先是关键的 S108N 的突变，然后增加了 N511 和 C59R 突变，最后增加了 I164L 突变[48-49]。其他新增突变见于一些特定地区如南美洲[50]。四级突变体 N51I-C59R-S108N-I164L 与磺胺多辛-乙胺嘧啶高水平耐药相关，也与氯丙胍-氨苯砜（一种尝试用于拮抗叶酸的类似磺胺多辛-乙胺嘧啶的复合物）的敏感性下降相关，据报道该突变主要发生在东南亚。然而，三级突变体 N51I-C59R-S108N 在非洲广为流行，也与磺胺多辛-乙胺嘧啶治疗失败密切相关[51]。该三级突变体 N51I-C59R-S108N 的 *pfdhfr* 基因首先出现于东南亚，随后几年遍布整个亚洲和非洲[52-53]。

对砜/磺胺（磺胺多辛是主要的抗疟成分）组中拮抗叶酸药物的耐药性是由 PfDHPS 酶突变所致，与野生型比，拮抗叶酸药物与该突变酶的结合力低[54-55]。磺胺多辛的耐药性追溯到 *pfdhps* 基因的一组顺序突变。最初可能是一个 A437G 的突变，随后其他突变增强了耐药程度[55]。这些耐药突变已经独立地出现多次，并在多个流行地区发生[56]。总之，磺胺多辛-乙胺嘧啶复合物的耐药性可能需要 *pfdhfr* 基因的 3 个突变（N51I-C59R-S108N），其治疗失败率随着 *pfdhps* 基因位点突变增加而增高。磺胺多辛-乙胺嘧啶临床治疗效果受其他宿主因素影响：如叶酸水平和获得性免疫力，药物吸收和代谢[51,57]。已证明环氯胍和乙胺嘧啶之间有交叉耐药[47-48,58]，因此，人们用对其他拮抗叶酸的药物如氯丙胍加氨苯砜（LapDap）治疗耐磺胺多辛-乙胺嘧啶寄生虫的兴趣已经受到限制。

1996 年阿托伐醌和氯胍组合在北美洲和欧洲注册，10 年内它成为最常用的抗疟药，用于预防和一线治疗非重症恶性疟。现在它是 ACTs 后的二线治疗药物。阿托伐醌是泛醌的类似物，能与线粒体呼吸链复合物Ⅲ的成分细胞色素 *b*（PfCytB）结合[59]，与氯胍联合使用，使线粒体膜电位陡然降低所需的有效浓度大大降低[60]。而且，氯胍能被人的细胞色素 P450 部分代谢为具有拮抗叶酸活性的环氯胍。由此导致的低血药浓度的环氯胍对阿托伐醌-氯胍治疗效果的影响仍有待证实。与叶酸拮抗剂一样，阿托伐醌的耐药性几乎立刻出现[61]。由于 PfCytB 突变，阿托伐醌与其结合效率比野生型减少，从而产生耐药性[62]。PfCytB 268 位密码子由酪氨酸置换为丝氨酸、半胱氨酸或天冬酰胺，与治疗失败密切相关，并产生高水平阿托伐醌耐药[63]，而且不能被氯胍阻止[64]。值得注意的是，这种耐药突变极少在流行地区检测到，但它似乎在原发感染过程中不断进化[65-66]。由于快速发展的耐药风险及高药物成本，阿托伐醌-氯胍在疟疾流行地区不再作为治疗的首选。

间日疟原虫是第二大最常见的疟原虫，其对抗疟药物的耐药性在许多地区仍远低于恶性疟原虫。近来，越来越多的关注集中在如何应对这种威胁，特别是关于氯喹的耐药性，它已经出现在间日疟流行的大多数国家[67]。然而，目前还没有明确的间日疟原虫对氯喹耐药的分子标志物。间日疟原虫复发来自于肝脏休眠子，对伯氨喹产生部分耐药性[68]，这是唯一对肝脏虫体有活性的药物。伯氨喹对肝脏复发的间日疟原虫抑制活性下降也与细胞色素 P450 2D6 的基因多态性密切相关[69]。关于间日疟原虫耐药机制，目前正在研究基因 *pfcrt*[70]、*pfmdr1*[71]、*pfdhfr*[72]和 *pfdhps*[73]同源序列的潜在作用。

最近，Blasco 等对抗疟药物耐药性进行了更全面的综述[74]。

二、滴虫病(thichomoniasis)

阴道毛滴虫(trichomonas vaginalis)感染是人类阴道炎及非病毒性性传播疾病最常见的病因之一[75]。阴道毛滴虫感染损害生殖道上皮，引起阴道分泌物恶臭，与妊娠的不良后果有关，如早产、低出生体重和对后代的长期影响。阴道毛滴虫感染也与 HIV 易感性增加和 HIV 感染者的病毒释放增加有关[76-78]。因此，有效治疗这种感染已成为一项重要的公共卫生目标[79-80]。

阴道毛滴虫是一种兼性厌氧寄生虫，毛滴虫病最常用 5-硝基咪唑类药物治疗，其中两种药物甲硝唑(metronidazole)和替硝唑(tinidazole)是美国仅有的被批准用于治疗滴虫病的药物。在等摩尔浓度下替硝唑比甲硝唑更有活性，如果甲硝唑治疗失败建议使用替硝唑[81-83]。然而，临床上对甲硝唑耐药的虫株可以对替硝唑产生交叉耐药。阴道毛滴虫的分子流行病学表明，临床耐药虫株是遗传相关的，集中在两个主要亚群中的其中一个[84-86]。一项对美国 6 个城市的性传播疾病诊所就诊女性的调查发现，4.3%的分离株表现出耐药性[87]，这表明美国近 16 万居民可能面临治疗失败的风险[79-80]。随着更敏感的核酸扩增试验的广泛使用，很可能会发现其他无症状感染，而这些感染用硝基咪唑治疗的疗效还不清楚。因此需要确定通常情况下如何处理无症状滴虫病，以及如何治疗无明显后遗症的无应答感染。

5-硝基咪唑以非活性形式被动扩散进入虫体，然后被还原为活性硝基自由基阴离子，通过破坏或干扰 DNA 导致虫体死亡。氢化酶体中大量的电子供体，包括铁氧还蛋白、丙酮酸铁氧还蛋白氧化还原酶(POFR)和苹果酸酶，是无线粒体寄生虫 ATP 的来源，对药物活化非常重要[88-90]。当一种或多种酶转录水平下降，药物活化水平较低时就发生了耐药。实验室产生的耐药虫株氢化酶体较小，然而临床耐药与这些酶的低转录水平或较小规模氢化酶体无相关性[91-92]。

硝基咪唑类药物也被黄素酶-硫氧还蛋白还原酶和硝基还原酶还原[86,93]。一个体外诱导的硝基咪唑类耐药虫株证实，硫氧还蛋白还原酶活性降低不是酶浓度降低的结果，而是由于缺乏必需的 FDA 辅助因子。而且，黄素抑制剂能使正常敏感虫株对高浓度甲硝唑耐药[94]。单核苷酸多态性(SNPs)在两个硝基还原酶基因中引入了过早终止密码子(premature stop codon)，与临床分离株甲硝唑耐药性增加有关，从而证实硝基还原酶在其中的作用[86]。硝基咪唑类药物耐药的第三个可能机制是减弱滴虫细胞内氧清除能力，导致还原的硝基咪唑类药物的再氧化进而失活。黄素还原酶 1 对滴虫体内氧的清除很重要，一些临床耐药分离株表达该酶的水平下降[95]。目前仍不清楚哪种机制，如果有的话，引起滴虫感染时临床硝基咪唑类药物耐药，但是临床分离株的序列分析发现，上述酶基因及一些特性未明基因的 SNPs 可能与耐药密切相关[96]。

甲硝唑耐药滴虫病患者的治疗通常会使症状即刻缓解，而且湿涂片阴性。然而，在 3～4 周内，即使没有进一步暴露于滴虫，症状也随着滴虫数量增多而复发。因此，监测长达一个月的治疗效果非常重要，在此期间鼓励患者避免无保护的性行为。当遇到硝基咪唑类耐药时，患者往往通过增大药物剂量、延长治疗时间而获得成功治疗[82-83]。然而，许多患者不能耐受高剂量的甲硝唑而提前终止治疗，这样可能只会加剧耐药的发展。而且，一些患者还对甲硝唑和替硝唑有过敏反应[97]。显然，有必要用硝基咪唑类的替代药物治疗阴道毛滴虫，但制药公司研发新药的积极性很低，因为甲硝唑是随处可买的非常便宜的仿制药，而且对大多数感染都有效。因此，对现有药物进行再利用或将其与硝基咪唑联合使用可能是一种有效的策略[98]。金诺芬是一种很有前景的药物，它过去用于治疗类风湿关节炎，通过抑制硫氧还蛋白还原酶在体外和动物模型中显示有抗阴道毛滴虫的活性[99]。然而其疗效在滴虫病患者中还没有评估。阴道内治疗用药，如肠道吸收较差或不能吸收的呋喃唑酮和硫酸巴龙霉素已成功治愈了一些患者，但总体上治疗效果有限[97,100]。聚维酮碘、硼酸和硫酸锌也显示对一些患者有疗效，但是需要进一步的临床试验[100-102]。

三、利什曼病

利什曼病(leishmaniasis)通过媒介白蛉传播给人，临床表现为多种综合征，从自限性的皮损到更为严重的黏膜或内脏损伤。病变的严重程度部

分取决于20余种利什曼原虫(*Leishmania*)中哪种虫体引起的感染。利什曼病是AIDS患者重要的机会感染,随着HIV-1阳性患者治疗失败增多和药物毒性增大,其鉴别诊断为治疗这种疾病提出了新挑战[103-104]。抗利什曼原虫药物由于高成本、实施难(需注射数周)和(或)相关毒性而使用受限。这些因素在利什曼病流行的发展中国家尤其重要,因为它们能导致治疗过早地自行终止,进而促进耐药水平增高。虽然已报道某些利什曼原虫属的分离株发生了真正耐药,其他虫种或分离株可能只是对某些化合物的固有敏感性有所不同,而宿主因素也影响药物疗效甚至失败[105-107]。真正的耐药更可能出现在人利什曼病中,如杜氏利什曼原虫和热带利什曼原虫,因为人畜共患的虫种主要感染动物,人只是偶然宿主,很少接触药物,是药物敏感虫株的保虫宿主[108]。

不管虫种或临床感染形式如何,长期以来治疗利什曼原虫感染的一线药物都是五价锑化合物,如葡萄糖酸锑钠(sodium stibogluconate)和葡甲胺锑酸盐(meglumine antimoniate)。与其他抗利什曼原虫药物相比,这些化合物便宜,但是在某些流行地区不再有效。例如,在印度比哈尔邦(Bihar),治疗由杜氏利什曼原虫引起的内脏利什曼病(visceral leishmaniasis, VL)的失败率高达65%[109]。药物疗效差有多方面原因,包括引起内脏利什曼病的原虫对锑剂固有的低敏感性,以及饮用水被砷污染[107,110-111]。真正耐药的证据来自一系列的观察:临床耐药患者分离的虫株比治疗有反应患者分离的虫株体外需要更高的药物浓度以杀死虫体[112]。然而利什曼病临床治疗结果与体外致病虫株药物敏感性之间的相关性并不总是很明确[105,108,113]。

前药五价锑在哺乳动物宿主细胞或寄生虫中还原为活性的三价形式,能增强巨噬细胞内细胞毒性,破坏寄生虫的氧化还原代谢。多种利什曼原虫属的许多耐药机制都涉及细胞内活性药物浓度降低[114-115]。其中一种机制是寄生虫表面水-甘油通道蛋白1(aquaglyceroporin1,AQP1)降低,导致对药物的摄取减少[116-117],引起皮肤利什曼病(cutaneous leishmaniasis,CL)的原虫比引起内脏利什曼病的原虫表达更高的AQP1,使得皮肤利什曼病对锑剂治疗更敏感。AQP1的表达差异与受3′端非翻译区调节的mRNA稳定功能有关[110]。

耐药性还与锥虫胱甘肽(trypanothione)或谷胱甘肽的合成增加有关,它们与三价锑离子结合,被ATP结合盒(ABC)转运蛋白内摄入细胞器中[114,118]。巯基合成相关酶或ABC转运蛋白的表达增加促进五价锑的耐药性,而抑制耐药株中这些途径则增加对药物的敏感性[115-116,118-121]。即使遗传关系较近的虫株中也可能出现一种以上耐药机制,增加了确定耐药机制的难度[114,117,122-123]。然而,五价锑依然是治疗皮肤利什曼病的首选药物[124]。

由于印度和尼泊尔部分地区对五价锑的高水平耐药,米替福新成为治疗内脏利什曼病的主要药物[106,125]。但已有报道,米替福新治疗后1年内复发率达20%[126]。与锑剂一样,米替福新的耐药性与其在细胞内浓度降低的机制有关,ABC转运蛋白抑制剂可以在体外恢复药物敏感性[127-129]。然而,最近的研究表明,这些机制并不能解释所有临床米替福新的耐药性;其他机制如寄生虫株的感染性也可能参与耐药的产生[125-126,130-131]。

印度次大陆目前用于治疗内脏利什曼病的主要药物是两性霉素B,它诱导寄生虫质膜上孔的形成[132]。两性霉素B以往由于其高成本和高毒性而使用受限,然而,新的两性霉素B脂质相关制剂大大降低了毒性,而且即使在低剂量给药时仍保持良好的疗效[133-134]。两性霉素B在治疗HIV感染者利什曼病方面似乎也优于锑剂[103-104]。两性霉素B脂质相关制剂被宿主单核细胞吞噬,积聚在吞噬细胞溶酶体中,利什曼原虫无鞭毛体寄居于此。有趣的是,尽管两性霉素B的作用方式被认为与锑剂大不相同,但对葡萄糖酸锑钠有较高耐药性的野外分离株在体外对两性霉素B也有较高的耐药性[127]。与其他抗利什曼原虫药物一样,两性霉素B的耐药性与较多的药物外排和巯基代谢的改变有关[135]。两性霉素B耐药虫株也表现出上调锥虫氧还蛋白(tryparedoxin)的级联反应,从而导致细胞内的毒性活性氧(reactive oxygen species, ROS)浓度下降[132]。

四、非洲锥虫病

布氏罗得西亚锥虫(*Trypanosoma brucei rhodesiense*)和布氏冈比亚锥虫(*Trypanosoma bru-*

cei gambiense)是非洲锥虫病(African trypanosomiasis,HAT)的病原体。这两个亚种分别在中非东部和西部流行,其中冈比亚锥虫引起了绝大多数感染[136-137]。由于这些寄生虫具有抗原转换机制,因而宿主免疫应答无效,针对这些寄生虫的疫苗开发前景渺茫。布氏冈比亚锥虫通常只感染人类,防控的关键是通过被动监测发现感染者并予以治疗。布氏罗德西亚锥虫可波及家畜和野生动物,因此,防控工作包括减少采采蝇媒介和对病例进行检测和治疗[136,138]。政治动荡事件及随后失去有效的公共卫生基础设施导致疾病死灰复燃。尽管如此,20 世纪 90 年代发生的 HAT 流行病目前已基本得到控制,2015 年报告的病例不到 3000 例[136]。现在有人乐观地认为,作为一个公共卫生问题,到 2020 年要消除 HAT,至少消除冈比亚锥虫感染[138]。

HAT 有两个阶段:最初是血流期,随后第二阶段侵犯中枢神经系统,导致与"昏睡病"相关的脑膜脑炎症状,对 HAT 来说"昏睡病"这个名字更为人所熟悉。两个阶段的 HAT 在没有治疗的情况下均可导致死亡,布氏罗得西亚锥虫感染进展更快,几周后进入第二阶段,6 个月即可死亡。相比之下,未经治疗的冈比亚锥虫感染的死亡通常发生在感染 3 年后[136]。

喷他脒和苏拉明是治疗第一阶段疾病的药物。它们不用于第二阶段的疾病,因为它们是高度离子化的,不能穿透血-脑脊液屏障。此外,由于苏拉明在盘尾丝虫病患者中可能引起严重的过敏反应,盘尾丝虫病通常与冈比亚锥虫引起的 HAT 同时流行[136-137],因此避免使用苏拉明治疗冈比亚锥虫。虽然临床对这些药物的耐药性似乎不是问题,但在疾病进展到血液淋巴期后才得到诊断,治疗可能会出现失败。晚期中枢神经系统疾病用美拉胂醇治疗罗得西亚锥虫感染,用依氟鸟氨酸或硝呋替莫-依氟鸟氨酸联合疗法(NECT)治疗冈比亚锥虫感染[136,139]。这些治疗 HAT 的药物难以施治,需要长期的治疗方案,并相对有毒性;这些问题可导致过早停止治疗,继而引起耐药性的产生。

就像利什曼病的治疗失败一样,对 HAT 药物产生耐药性与药物摄取减少有关。喷他脒和美拉胂醇与氨基嘌呤有相同的脒基样基团,可以被锥虫膜中核苷转运蛋白识别并主动吸收[137]。其中一个受体布鲁锥虫 P2 腺苷转运蛋白即 TbAT1 已经被广泛研究;对喷他脒和美拉胂醇的耐药性与 TbAT1 表达突变所致的功能缺失有关,实验室诱导的和野外分离的耐药虫株表现出相同的点突变[137,140-141]。然而,*tbat*1 基因敲除寄生虫仅部分产生耐药,从而发现水甘油通道蛋白 2(AQP2)在 HAT 耐药中作用。引起 AQP2 缺失或 AQP2 和 AQP3 间形成嵌合体的突变导致对美拉胂醇的敏感性降低 3～5 倍,对喷他脒的敏感性降低 40～50 倍[141-143]。将野生型 AQP2 重新导入耐药临床分离株可恢复药物敏感性[144]。然而,并非所有治疗失败都可归因于 AQP2 功能障碍,这表明其他机制甚至患者因素,如营养、免疫状态或与其他寄生虫的共同感染也可能导致治疗失败[145]。

到目前为止,对依氟鸟氨酸和硝呋替莫的临床耐药性还没有报道。然而实验室菌株可以很容易诱导出对这两种药物的耐药性[146-147]。依氟鸟氨酸耐药性与一种负责药物吸收的非必需氨基酸转运蛋白的缺失有关,引起了人们对野生分离株容易发展耐药性的关注[146]。最近的一项研究表明,口服非昔硝唑(fexinidazole)治疗冈比亚锥虫感染的治愈率与 NECT 相似,而治疗相关不良事件并未增加,使得人们对于实现 2020 年消除锥虫病的目标更加乐观[148]。

五、血吸虫病

吡喹酮是目前用于治疗血吸虫病(schistosomiasis)的唯一药物。它可以有效治疗所有感染人类的血吸虫,并通过大规模药物治疗(mass drug administration,MDA)构成血吸虫病控制计划的支柱。通常情况下,单一药物广泛用于众多人群是导致耐药性形成的原因。然而,尽管发现了一些潜在的临床吡喹酮耐药事件[149],但在相当长的时间内一些高强度治疗的地区,血吸虫病也没有出现广泛的耐药性[150-152]。这一偶然现象可能是由于血吸虫在接受治疗的人类体内没有无性繁殖,尽管它确实发生在中间宿主螺体内。因此,与原生动物寄生虫不同,血吸虫繁殖过程中没有选择性的药物压力,从而使得耐药性不易发生。具有讽刺意味的是,在血吸虫病控制计划中,MDA 的不完全覆盖为未受治疗的蠕虫留下了足够大的避难所,这也可能阻止对吡喹酮广泛耐药性的出现[153]。

尽管如此，利用来自未治愈个体粪便中的虫卵已建立的小鼠感染模型，证实可以产生耐药表型[154-156]。实验室和现场研究也显示，吡喹酮治疗后血吸虫多样性降低，提示存在遗传瓶颈，这是耐药性发生的警告信号[157-158]。然而，这一观察结果并非在所有的现场研究中都是一致的[159-161]。在考虑血吸虫治疗失败时，重要的一点是要区分导致药物疗效下降的特征与真正耐药性的差异。例如，与蠕虫感染较轻的人相比，感染水平高的患者不太可能通过单剂疗法治愈[162]。这一结果在一定程度上与吡喹酮只对成虫有效有关，即使在最佳条件下，单一剂量也不能证明完全有效[153]。未成熟蠕虫可能出现于药物治疗期间，特别是在高传播区域，它们对吡喹酮不敏感，随后发展为明显的感染，给人以治疗失败的印象。因此，间隔 4～6 周的两次疗法比单一治疗更有效，当怀疑有耐药时应尝试两次疗法[163-164]。在高传播区域的快速再感染也应被视为疑似吡喹酮治疗失败的可能原因[165-166]。

吡喹酮的作用机制还不清楚，这使得对吡喹酮耐药发生和机制的认识更加困难。血吸虫钙离子通道唯一的 β 亚基是吡喹酮的分子靶标，随着治疗可迅速诱导蠕虫皮层钙依赖性的持续性肌肉收缩[167]。吡喹酮对成虫皮层的损伤使成虫易受宿主免疫反应的攻击和杀灭。耐药虫株比易感虫株表现出更小的由吡喹酮引起的皮层损伤[168]。一种潜在的耐药机制可能有助于解释幼虫和成虫对吡喹酮的相对敏感性的差异。与成虫相比，P-糖蛋白 ATP 依赖性外排泵同源物在吡喹酮敏感性降低的虫株和幼虫中的表达增加[169-171]。用药物抑制该外排泵，或通过 RNA 干扰抑制其表达，可以使幼虫和其他耐药成虫对吡喹酮的敏感性增加[172]。幸运的是，这些抑制药物是安全的、便宜的，并获准供人类使用，从而提供了一个有力的方法以战胜出现的吡喹酮耐药性。

随着 MDA 项目越来越多地用于血吸虫病防控，人们有理由担心，依赖单一药物可能会促进耐药性的发生。这种风险再次表明，需要持续监测吡喹酮耐药性的发展，努力研发新药或重新定位现有的化合物来治疗血吸虫病[153,173-174]。

六、展望

有几个因素导致了寄生虫耐药性的发生。那些生活史短、繁殖率高的寄生虫在传播性强的地区最有可能发展出耐药亚群。当寄生虫反复暴露于非理想药物浓度时，就促进了耐药种群被筛选出来。这种模式可能是由于使用半衰期长的药物，或者更常见的，频繁地、常常不合理地使用剂量不足的药物造成，这种情况在寄生虫感染流行的国家是普遍现象。公共卫生干预纠正这些因素并不总是有效，可以通过更好地了解寄生虫的耐药机制而获益。耐药机制非常多样化，很难研究，但最近的技术进步提供了期待已久的工具将助力这项任务。已完成了几种疟原虫、阴道毛滴虫、硕大利氏曼原虫（*L. major*）、布氏锥虫、曼氏血吸虫和埃及血吸虫的基因组序列分析。例如，当这些数据与微阵列技术或全基因组测序技术相结合，并将耐药寄生虫株的 DNA 与敏感虫株进行比较时，对耐药基因的鉴定应比过去几年进展得更快。此外，基因组学、转录组学和蛋白质组学数据也可能有助于设计新的化疗药物，因为它们有助于研究人员确定寄生虫的代谢过程，这些代谢过程与人类宿主的代谢过程完全不同，从而能够开发出有效的治疗方法。

本文的发现和结论仅代表作者观点，不一定代表疾控中心的观点。

参考文献请扫二维码查阅

第154章 抗寄生虫药物和敏感性试验方法

JÉRÔME CLAIN, JACQUES LE BRAS, W. EVAN SECORN

（郭大文 译；苏建荣、陈家旭 审校）

确定寄生虫对抗寄生虫药物反应的准确方法在多个层面上是有用的。它们可以辅助患者的临床管理，为指导药物使用的政策和公共卫生干预提供流行病学信息，并为开发新的更好的药物提供重要的研究工具。药敏试验可分为四大类：体内试验、体外试验、动物实验和分子试验。

患者体内试验可直接评估现有化合物的临床疗效。这些试验应用到流行病学调查中，适当的技术要求使它们适合在发展中国家的现场研究使用。体内试验受到宿主因素（如免疫或药物吸收或代谢的变化）或环境因素（如再感染）等潜在干扰的限制。然而，这些试验已被证明有助于指导药物使用，特别是对疟疾的治疗。

体外试验通过从宿主中分离寄生虫并在受控的实验室条件下进行培养研究来避开这些干扰，这为重复评估多种化合物（包括实验化合物）提供了机会。然而，体外试验在技术上要求更高，因此不适合在现场条件下开展。它们最适合于研究经培养能够以几何倍数快速繁殖的寄生虫，主要为原虫，而在评估必须由宿主激活的非活性药物前体或其抗寄生虫活性需要宿主免疫防御协系统协同作用的药物方面作用有限。

动物模型实验能够研究不能体外培养的寄生虫或尚未批准用于人类的药物。这种方法具备了人体内药物测试的优点，而不会使人接触可能无效的毒性药物。然而，该方法的使用需要有合适的感染动物模型和适当的实验动物维护设施。此外，为使动物模型有相关性，所研究药物在所使用的特定模型中的药代动力学应与在人体中相似。

分子试验检测与耐药性相关的潜在遗传变异，具有独特的优势。微量的无活性寄生虫遗传物质即可用于核酸扩增试验。它们可批量处理，用于大规模的流行病学研究。分子分析可以避免感染单个宿主的多种寄生虫（有时在体内或体外试验中会遇到）带来的潜在干扰，并对宿主内寄生虫种群进行鉴别。分子诊断程序耗时短（数小时），可能用于指导患者管理。体内和体外试验通常需要更多的时间（数日或数周），其结果主要用于流行病学监测和实验性化疗研究。分子试验检测的缺点在于它们的技术要求高，以及需要确定测试基因与耐药性的相关性。然而，由于开发了更实用的操作规范和更强大的自动化设备，以及对耐药基因的更多了解，分子技术正被用于越来越多的实验室及现场设施。

这些不同种类的试验能够提供互补信息。一方面，分子试验在最基本的生物学水平上研究寄生虫，不受任何外界干扰。另一方面，患者体内试验反映了宿主和寄生虫之间复杂的相互作用，对临床医生和公共卫生工作者极为重要。虽然不同试验方法应有良好的相关性，但应预计到由于宿主或培养条件等相关因素会导致一定程度的差异。事实上，对这种差异的正确分析将会更好地了解药物的作用机制和耐药机制。

这些观点将在接下来对5种化疗受到挑战的寄生虫病的讨论中进行论述。表154-1总结了这些方法。

表 154-1　抗寄生虫药物及其药物敏感性试验方法[a]

疾病与药物	试验方法(s)	备注
疟疾[b] 氯喹、阿莫地喹、奎宁、甲氟喹、本芴醇、哌喹、咯萘啶、青蒿素、磺胺多辛-乙胺嘧啶、阿托伐醌-氯胍、伯氨喹、多西环素、克林霉素等	恶性疟原虫或间日疟原虫患者体内试验。恶性疟原虫红细胞期的培养。评估的标准是:①显微镜检查(从环状体到裂殖体的成熟;寄生虫增殖和存活),②代谢活性(掺入[^{3}H]次黄嘌呤;产生 pLDH 和 HRP2),③DNA 定量 用 PCR 扩增分析疟原虫(主要是恶性疟原虫)可能参与青蒿素衍生物(*k13*)、哌奎(*pfplasmepsin2*)、氯喹(*pfcrt*、*pfmdr1*)、甲氟喹(*pfmdr1*)、叶酸拮抗剂(*dhfr* 和 *dhps* 基因)、阿托伐醌(细胞色素 *b*)和其他耐药的相关基因突变	耐药性是一个主要问题,特别是恶性疟原虫;它也发生在间日疟原虫。试验用于流行病学评估和实验室研究。短期培养试验也用于间日疟原虫红内期。在实验的基础上,体外试验可以确定药物对肝期和有性期(配子体)的影响
滴虫病[c] 甲硝唑和替硝唑	在需氧和厌氧条件下培养 评估的标准是寄生虫的活动性 PCR 检测将终止密码子引入硝基还原酶基因的突变	对甲硝唑的耐药性是相对的;试验在较大的浓度范围内进行。结果不影响替代治疗方法
利什曼病[d] 葡萄糖酸锑钠,锑酸葡甲胺,喷他脒,两性霉素 B,巴龙霉素和米替福新	前鞭毛体的培养。评价标准:用显微镜计数寄生虫数量和检测代谢活性(酸性磷酸酶活性;刃天青或四唑盐的转换) 巨噬细胞系无鞭毛体的培养。通过显微镜检查计数细胞内染色寄生虫,或无鞭毛体转化回前鞭毛体并通过有限稀释计数进行计数	大多数药物存在的问题是高成本、难以施治和毒性。有些地区五价锑的失败率很高。选择前鞭毛体或无鞭毛体试验因受试药物而异。细胞内无鞭毛体试验显示与临床药物疗效有较好的相关性,但不是绝对的
非洲锥虫病[e] 喷他脒,苏拉明,美拉胂醇和依氟鸟氨酸	锥虫的培养和评价: 显微镜检查计数寄生虫或刃天青还原 PCR 和 RFLP 分析	体外试验主要用于实验室研究。检测负责药物吸收的水甘油通道蛋白 2 转运体的突变可能适用于现场试验
血吸虫病[f] 吡喹酮	通过存活、运动或代谢检查疑似耐药株感染实验中成虫的损害程度 与药物一起培养时毛蚴的形态	由于药物效应对宿主免疫应答的依赖性,需要进行体内动物实验来确认。自动检测蠕虫活动性或代谢对新药研发比临床耐药性评估更有用

注:[a] 详见文中;[b] 主要由恶性疟原虫、间日疟原虫、卵形疟原虫,三日疟原虫和诺氏疟原虫引起的疾病;[c] 由阴道毛滴虫引起的疾病;[d] 由一种或几种利什曼原虫引起的疾病;[e] 由罗德西亚布氏锥虫和冈比亚布氏锥虫引起的疾病;[f] 主要由曼氏血吸虫、日本血吸虫和埃及血吸虫引起的疾病

一、疟疾

疟疾的大多数耐药性试验集中在最流行、最具毒力、也是最容易产生耐药性的恶性疟原虫。最初对疟疾耐药性的认识大多在临床观察到,而且经常被体内试验证实。体内试验(译者注:此处原文是 *In vitro*,译者认为应该是 *In vivo*)的目的是让疟疾感染患者接受标准剂量试验药物治疗并在受控条件下监测,记录其寄生虫学和临床反应。最初世界卫生组织在恶性疟原虫体内试验中对氯喹的反应进行了标准化,后来又进行了多次修改以其他药物提高的性能并评估这些药物[1]。自 1996 年以来,开展了越来越多的体内试验对药物方案进行比较,这对评估恶性疟原虫对以青蒿素为基础的联合治疗的反应很有必要[2]。关于作用迅速的青蒿素衍生物,已经开发了测定寄生虫清除时间和确定标准临床转归的方法[3]。然而,研究设计和分析方法的多样性削弱了从不同流行地区监测抗疟药物疗效随时间变化的可能性[4]。决定治疗反应的关键因素包括疟原虫种类、治疗转归、免疫水平,以及区分初始感染的再发和复发(如间日疟原虫)或再感染的调整方案。结合药代动力学参数对于确定与青蒿素配伍的药物的真正耐药性很重要,因为配伍药物通常吸收不良或清除缓慢[5]。

含有人肝细胞和红细胞的实验性人源化小鼠模型取得早期成功,可对人体寄生虫进行临床前研究,并对尚未批准用于人类的药物进行测试[6-7]。

标准的体外抗疟药敏试验是在接近体内环境的条件下给予系列浓度药物，测定红细胞内疟原虫在24～72 h内从环状期（患者外周血中发现的唯一无性期）到裂殖期的体外生长情况。标准检测方法是用Trager-Jensen培养参数（厌氧及含人血清的缓冲RPMI培养基）设计了一种非常适用的96孔微孔板，这是最常用检测方法的基础[8-9]。这一最简单的试验方法可以适用于现场工作中，培养基中加入100 μl指尖血，于蜡烛缸中孵育24～30 h，显微镜计数含多个核的裂殖体，根据药物反应曲线计算50%药物抑制浓度（IC_{50}）和IC_{90}或IC_{99}[10]。这一最简单的检测方式从1980年到1990年通过世界卫生组织制备成标准试剂并商业化，除此之外还开发了其他具有优势的体外试验[11]。所有试验均适用于现场采集的寄生虫和实验室长期培养的非同步化生长的寄生虫，也可用于筛选有潜力的新抗疟药物、研究药物作用方式或耐药模式。

一些抗疟药如奎宁和青蒿素的活性和耐药性，只作用于部分无性红内期。这意味着当使用实验室长期培养的来自患者的分离株或参考克隆株时，环状体期的同步化可提高药敏结果的重复性。疟原虫的生长和抑制可用不同的方法评估。培养物涂片的显微镜计数检查烦琐且重复性差。[^{3}H]次黄嘌呤掺入试验提供了一种半自动化、可定量及高通量的方法，但要在授权实验室使用放射性材料及专用设备，由于要处理放射性废物而造成成本上升[12]。高表达的疟原虫蛋白，如乳酸脱氢酶[13]或富组蛋白2[14]可用双位点酶联免疫吸附试验进行检测，尽管该法耗时长，商业化试剂盒成本高，但比放射性核素方法更敏感[15]。其他方法用SYBR绿色荧光染料检测疟原虫成熟过程中产生的DNA[16-17]。

所有体外试验的成功完成和解释取决于几个因素，而这些因素又取决于样品的特性、材料、培养和产生抑制常数的统计方法。标本相关因素包括患者最近服用抗疟药物，这可能会降低试验成功率；寄生虫接种量高，可能导致高估某些药物的耐药性[18]；培养基中的叶酸和对氨基苯甲酸在体外试验中抑制叶酸拮抗药物的效应[19]。另一个标本因素是红内期恶性疟原虫在体外的寿命短，在4℃下每过一天都会降低它们在体外生存和生长的能力[20]。

实验室药敏试验的关键步骤包括必须制备药物稀释液并将其分配到微孔板中，这对氯喹以外的一些药物特别困难，因为大多数药物溶解性差或保质期有限。培养需要补充含人血清或牛血清白蛋白（AlbuMAX）的RPMI培养基，尽管会因它们与药物的相互作用不同而影响IC_{50}[21]。所有这些基本的方法学问题随时间破坏实验室间或单个实验室内体外敏感性的精确比对。一致性体现在培养参数上，改进建议包括关键参数的质量控制措施，如预制剂量微孔板（滴定药物溶液），分离株与已知敏感性的参考克隆株敏感性终点参比[22]。最终，可能通过免费的网络工具进行药物浓度抑制试验的标准化数学分析[23-24]。用改进的S曲线最大效应（E_{max}）模型拟合算法确定与IC_{50}相关的药物浓度，并显示IC_{50}估计的精度。然而，上述标准的体外抗疟药物敏感性试验不能区分速效青蒿素衍生物的敏感性和耐药性，对此类药物最近开发了特定的操作规范[25-27]。这些新的试验用于检测疟原虫早期环状体暴露于瞬时高浓度青蒿素药物的生存能力（因此称其为环状体存活试验，RSA），更好地模拟疟原虫在体内所处环境。一项柬埔寨疟原虫分离株的研究显示，RSA检测的存活率与体内虫体清除半衰期有关[26]。使用IC_{90}而不是IC_{50}或哌喹存活率分析也能更好地研究哌喹敏感性的降低[28-29]。

已经建立的研究疟原虫生活史各个阶段抗疟疗效的试验更适合于药物研发目的而不是常规实验室使用[30]。然而，显微技术已经被用于检测红内期间日疟原虫[31]，也可以体外培养肝期和红细胞内有性期的疟原虫属和恶性疟原虫，尽管试验步骤较烦琐[32-33]。

已经发现一些主要抗疟药物的遗传标记，这使得开发评估疟原虫耐药性的分子手段成为可能。氯喹耐药性与恶性疟原虫消化液泡膜上的氯喹耐药性转运蛋白K76T的改变有关[34-35]。恶性疟原虫多重耐药基因1（*pfmdr*1）编码与人ABC转运蛋白具有同源性的P-糖蛋白，这类转运蛋白可以通过消化液泡将毒性组分转运出去。*pfmdr*1基因的点突变和基因扩增在不同程度上与多种抗疟药的敏感性改变有关，包括以青蒿素为基础的联合疗法（氯喹、阿莫地喹、奎宁、本芴醇、甲氟喹和活性青蒿素代谢物二氢青蒿素）[36-38]。编码空泡蛋白酶的*plasmepsin* 2基因扩增与临床哌

喹耐药有关[39-40]。

关于青蒿素，一种叫作K13的Kelch蛋白的几种氨基酸改变(主要是C580Y)导致东南亚恶性疟原虫对青蒿素产生耐药[41-42]。对叶酸拮抗剂如磺胺多辛-乙胺嘧啶的耐药性已证实与恶性疟原虫二氢叶酸还原酶[43-45] S108N、C59R和N51I的联合突变有关，间日疟原虫也有其同系物[46]。另外，恶性疟原虫对叶酸拮抗剂高水平耐药与二氢叶酸还原酶I164L的改变[43,47]或磺胺类药物靶位二氢叶酸合成酶的改变有关[48]。阿托伐醌-氯喹耐药与恶性疟原虫线粒体细胞色素b基因密码子Y268的替换有关，氨基酸变为S、N或C，导致高水平耐药[49]。这种遗传多态性可以通过各种标准技术在单个疟原虫分离株中得到鉴定，这些技术包括突变特异性巢式PCR[50]或PCR后进行Sanger测序[51]、限制性片段长度多态性(RFLP)分析[52]，以及单核苷酸引物延伸在毛细管测序仪上检测荧光产物[53]，或DNA微阵列法[54]。下一代测序技术可以准确、高通量地检测来自混合或单个疟原虫分离株的靶向耐药基因型[55-56]。药物耐药性的基因分析和发现加速了全基因组测序技术的应用[39,41,57]。在混合疟原虫分离株中分析单倍型的可能性可以提高我们发现联合突变临床相关性的能力[58]。

正确使用体内、体外和分子检测可以产生有价值的互补信息，使人们在耐药性扩散导致发病率升高前调整药物方案[59-60]。

二、滴虫病

阴道毛滴虫引起美国和世界范围内最常见的非病毒性性传播传染病，而甲硝唑和替硝唑是目前美国FDA批准的仅有的两种治疗滴虫病的药物[61]。美国性病门诊，4.3%的阴道毛滴虫感染患者对甲硝唑有一定程度的耐药，标准治疗方案可能对大约160 000个体病例无效[62-63]。幸运的是，药物敏感性试验已经证实有助于确定替代治疗方案，这些方案通常能够成功地对患者进行有效治疗[64]。5-硝基咪唑类药物的体外药敏试验表明标准方案对感染患者治疗失败[65]。

阴道毛滴虫的药敏试验是检测药物存在下寄生虫活动性的一种简单测定法[66]。在U形微孔板中使用胰蛋白酶解酪蛋白-酵母-麦芽糖(TYM)培养基无菌培养毛滴虫，培养基中加入用二甲基亚砜溶解的甲硝唑或替硝唑(0.2～400 μg/ml)，并用适当浓度的二甲基亚砜作平行对照。平板在37℃孵育48 h，然后用倒置相差显微镜进行显微镜检查。未观察到活的虫体的最低药物浓度被定义为最低致死浓度。甲硝唑最小致死浓度大于100 μg/ml时与临床耐药性相关[67]。该方法已用于测定IC_{50}，并通过测定[^{3}H]胸腺嘧啶核苷掺入[68-69]、酸性磷酸酶活性[70]或ATP依赖性发光[71]等试验筛选抗滴虫新化合物的活性。这些改良方法尚未被用于监测临床分离株的耐药性，但理论上还是很容易实现的。

体外培养方法评估阴道毛滴虫分离株耐药性的困难之一是需要从临床标本中获得无菌虫体进行培养。由于滴虫病患者通常伴有其他性传播疾病病原体感染，这些病原体也在TYM培养基中生长，这可能需要较长的时间进行筛选。通过检测产生过早终止密码子的单核苷酸多态性(SNP)可以对硝基还原酶水平降低引起的硝基咪唑耐药性进行分子检测[72]。对甲硝唑敏感和耐药的阴道毛滴虫分离株的Illumina测序表明其他对硝基咪唑耐药的遗传标记可以被鉴定出来[73]。阴道毛滴虫耐药分子标记的前景是令人兴奋的，因为它可能通过PCR技术分析耐药性，无须进行无菌培养，从而减少了确定分离株是否具有耐药性所需的时间。耐药标记的分子鉴定还可以直接检测患者的标本，如疑似携带耐药株的患者，或NAATs检测到有持续无症状感染但没有足够的虫体用于传统方法的培养和检测的患者。

三、利什曼病

利什曼病的治疗失败可能是由于真正的耐药性，利什曼原虫对药物敏感性的先天差异，或者是患者因素如免疫缺陷，这些因素阻碍了药物治疗的有效作用。区分这些可能导致治疗失败的原因无论对于个体患者的治疗还是大众公共卫生都很重要[74]。药敏试验可以使用前鞭毛体的无菌培养物或无鞭毛体的细胞内培养物进行。前鞭毛体培养更容易操作，更适合用于临床分离株，并具有更高的通量。然而，它们只对不需要细胞激活机制的药物如米替福新和两性霉素B产生可靠的临床

效果[75-76]。相比之下，使用更广泛的五价锑需要宿主细胞还原为活性三价锑形式，药敏试验推荐检测细胞内利什曼原虫的无鞭毛体[77]。无鞭毛体试验也被认为更具临床意义[74]。遗憾的是，细胞内检测工作量大，依赖于宿主细胞，并且需要更大的适应性，这会导致临床分离株的差异。由于缺乏评估利什曼原虫耐药性的标准化方案，给实验室和流行环境之间的试验比较带来挑战[74,78]。

前鞭毛体分析是在含药物的标准细胞培养基（RPMI 或 M199）中添加小牛血清，在 26～37℃下培养 42～72 h，通过检测 600 nm 处的吸光度[79]、酸性磷酸酶活性[80]、刃天青还原[76,81]，或四唑盐的转化率[MTT：3-(4,5-二甲基噻唑-2)-2,5-二苯基四氮唑溴盐；XTT：2,3-双-(2-甲氧基-4-硝基-5-磺苯基)-2H-四唑-5-羧苯胺；或 WST-8：2-(2-甲氧基-4-硝基苯基)-3-(4-硝基苯基)-5-(2,4-二磺苯基)-2H-四唑]来评价活力[82-84]。每种检测方法都有其独特的优点和局限性。酸性磷酸酶和四氮唑盐转化是比色分析法，可以用标准微孔板阅读器读取，而刃天青分析法需要荧光检测器。刃天青（阿拉玛蓝）、MTT 和 XTT 有商业化试剂，便于使用。四唑盐的直接比较表明 WST-8 的性能优于 MTT 和 XTT[84]。由于刃天青和 XTT 不需要裂解细胞（而 MTT 需要）或其他寄生虫操作来读取分析结果，因此可以在初始培养进行动力学分析后的不同时间点监测药物活性。

无鞭毛体试验用从临床样本中分离的前鞭毛体感染巨噬细胞系（如 U-937、J774 和 THP-1），在 34～37℃下与不同浓度的测试药物孵育 2～7 天[79-80,83,85-86]。将无鞭毛体感染的巨噬细胞暴露于药物后，对细胞进行染色，以显微镜计数药物处理组和对照组中感染巨噬细胞的比例和每 100 个巨噬细胞中无鞭毛体的数量。通常，每种药物浓度重复测定 3 次或 4 次。或者，在感染细胞与药物孵育后，控制巨噬细胞裂解以释放无鞭毛体，这些无鞭毛体随后转化为前鞭毛体，并通过有限稀释计数[83]。

随着利什曼原虫耐药分子机制的进一步明确，可以利用 PCR 和 SNPs 的 DNA 测序技术对耐药菌株进行流行病学研究。已从内脏和皮肤两种利什曼原虫的药物转运、应激反应、硫醇和氧化还原代谢基因中鉴定出耐药相关 SNPs[87-88]。这些方法很有意义，因为除了培养寄生虫外不需要任何操作。然而，这些方法的适用范围很可能受到虫种和药物的限制，无法发现新的耐药机制。

四、非洲锥虫病

与利什曼原虫药敏试验一样，锥虫与药物体外培养，通过直接计数或与刃天青孵育进行荧光检测来监测其活性[89-91]。锥虫在 37℃、5%的二氧化碳环境中，在添加 HEPES 缓冲液、β-巯基乙醇和热灭活牛或马血清的 Iscove 或基础培养基中培养 24～72 h，在培养的最后 4 h 加入刃天青，在 530 nm 激发波长和 590 nm 发射波长处读取药敏结果[89-91]。然而，这些方法对于筛选新化合物比评估临床分离株的耐药性更有价值，因为适应无菌培养而发生的改变可能会对虫体施加选择性压力，从而改变其重要特征[78]。

非洲锥虫对喷他脒和美拉胂醇的耐药性主要是由于其吸收所需转运蛋白功能发生突变，导致细胞内药物浓度降低。PCR-RFLP 分析可用于评估治疗后复发患者分离株的耐药性[92]。通过这种方法发现，治疗失败时，功能性水甘油通道蛋白 2（AQP2）丢失的影响比氨基嘌呤转运蛋白 P2 更重要[93-95]。由于无需培养，PCR-RFLP 更容易提供患者标本的耐药性信息。然而，只检测一个转运蛋白有可能遗漏其他可能的耐药机制。一个恰当的例子是使用微卫星标记和全基因组测序检测复发患者分离株，发现 AQP2 突变可能不是人类非洲锥虫病临床耐药表型的唯一原因。另外可能还有多达 23 个影响美拉胂醇敏感性的基因，而且非寄生虫因素如宿主免疫和营养状况也很重要[96-97]。确认该试验的实用性需要评估更多的临床耐药菌，但它在个体感染病例的管理和追踪人群中耐药传播方面有很大潜力。

五、血吸虫病

血吸虫的耐药性检测在目的和方法上与原生动物类寄生虫有很大不同。成虫在终宿主体内并不进行复制，因此避开了快速发展为耐药性的一个相关机制。所以，即使血吸虫病的首选药物吡喹酮曾被大规模使用，也没有出现广泛的耐药性[98-100]。因此，很少需要对个体感染进行耐药性

评估。然而,仅依赖单一药物是有风险的,而且血吸虫已经对其他药物产生了耐药性,因此需要有监测吡喹酮耐药性的技术。成虫不能进行自我复制使得药物敏感性试验更具挑战性。耐药性的研究通常是从治疗不成功的哺乳动物宿主获得虫卵,感染适宜的中间宿主螺,从感染螺中分离尾蚴,再感染并治疗实验动物。小鼠中抗微生物化合物 50%有效剂量的测定方法已经建立,并在不同实验室间证实有良好的重复性[101]。这种方法的缺点是非常耗时,而且对技术要求较高,特别是在可能没有较好的实验性螺和啮齿动物的血吸虫病流行地区。

50%有效剂量也可以在体外试验中通过冲洗出的虫体与吡喹酮共同孵育后虫体的收缩或代谢来估算,并与体内试验结果有较好的一致性[102-104]。尽管这种方法没有感染、治疗和灌注小鼠复杂,但仍然需要野生螺和小鼠来获得成虫,以及时间和专业技能以维持其生活史周期。此外,成功感染小鼠的血吸虫也不一定准确地代表现场分离虫株的多样性,而一种能够解决这些问题的体外方法已用于现场调查[105-106]。从感染者粪便中分离出虫卵,孵化出毛蚴,将其暴露于吡喹酮中,监测药物对其形态的影响。当使用这项技术时,从感染后用药物治疗而清除虫体的患者体内获得的毛蚴比那些从没有清除感染的患者粪便中分离的毛蚴更容易受到药物的影响。用患者粪便中获得的虫卵孵化出的毛蚴评估寄生虫种群结构的变化是监测潜在耐药性的另一种方法。治疗后血吸虫遗传结构的改变表明吡喹酮治疗有效,而保持相同的微卫星分布则表明治疗失败[107-108]。持续监测耐药性的发展将是依赖于大规模药物管理的血吸虫病控制计划的一个重要组成部分。

六、展望

多数抗寄生虫药物的敏感性试验并不在临床诊断实验室中常规开展,因为这些实验不常用到,而且需要特殊技术要求。这些实验主要在参比或研究实验室进行,或在寄生虫病流行区的流行病学调查期间进行。由于实验室技术和寄生虫基因分析的最新进展,现有的药敏试验手段越来越先进,内容越来越丰富。开发可靠且简单易行的实验技术将有助于现场试验优化现有可用药物的使用。这些现场试验是实验室尖端研究技术的补充,其主要方向是开发新型抗寄生虫化合物和破解耐药机制。

本文的发现和结论仅代表作者观点,不一定代表疾控中心的观点。

参考文献请扫二维码查阅

索　引

A

C

D

E

F

H

J

K

L

M

N

O

P

Q

R

T

Y

Z

彩　插

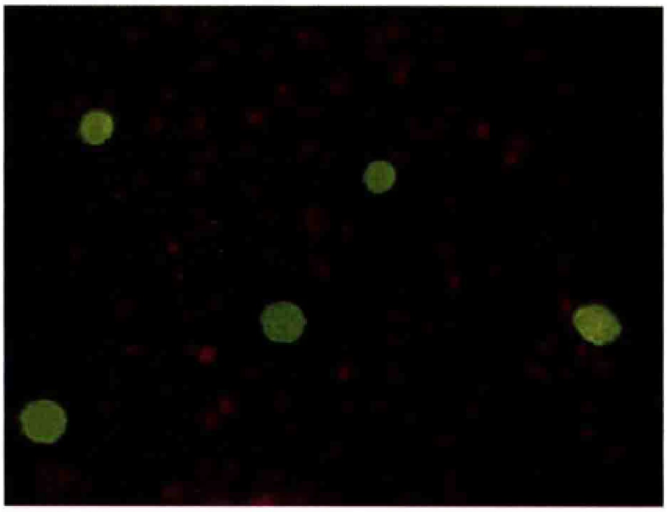


图 82-1

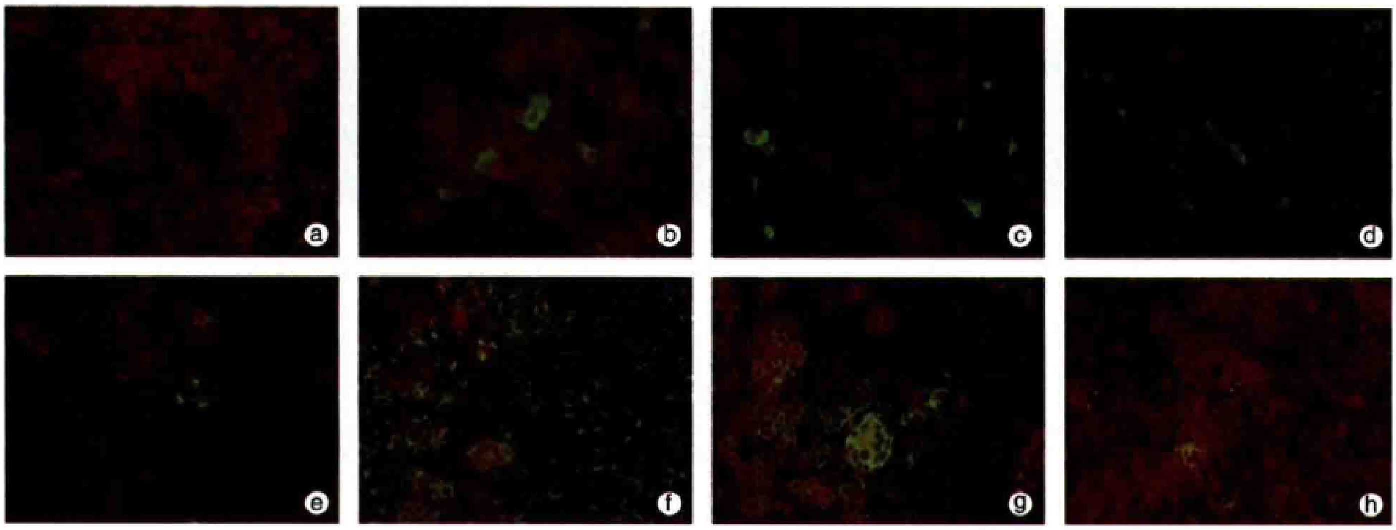


图 82-2

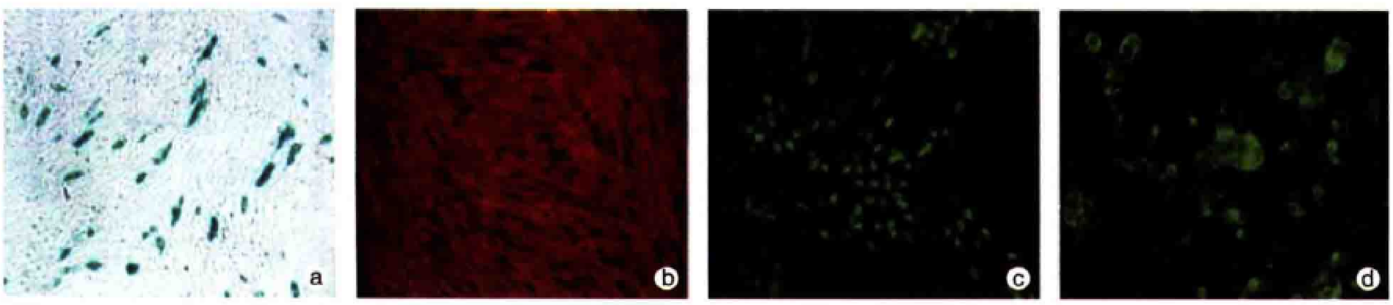


图 82-3

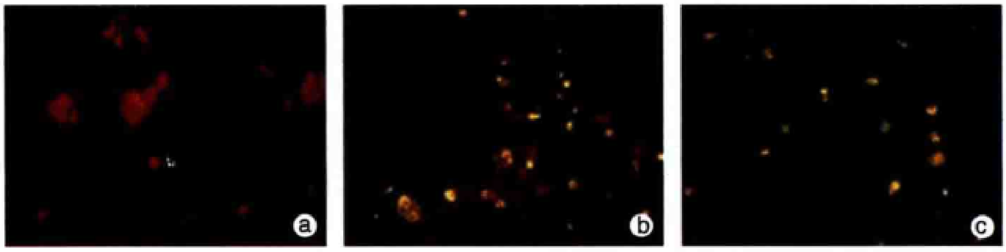


图 82-4

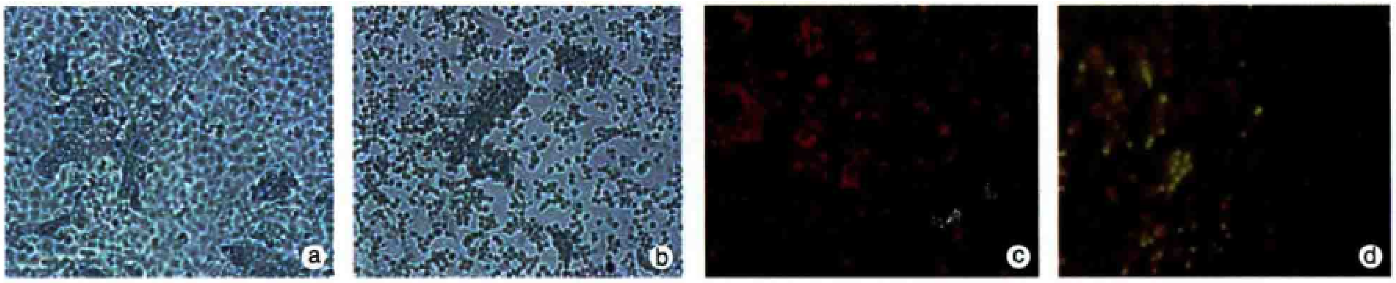


图 82-5



图 82-6

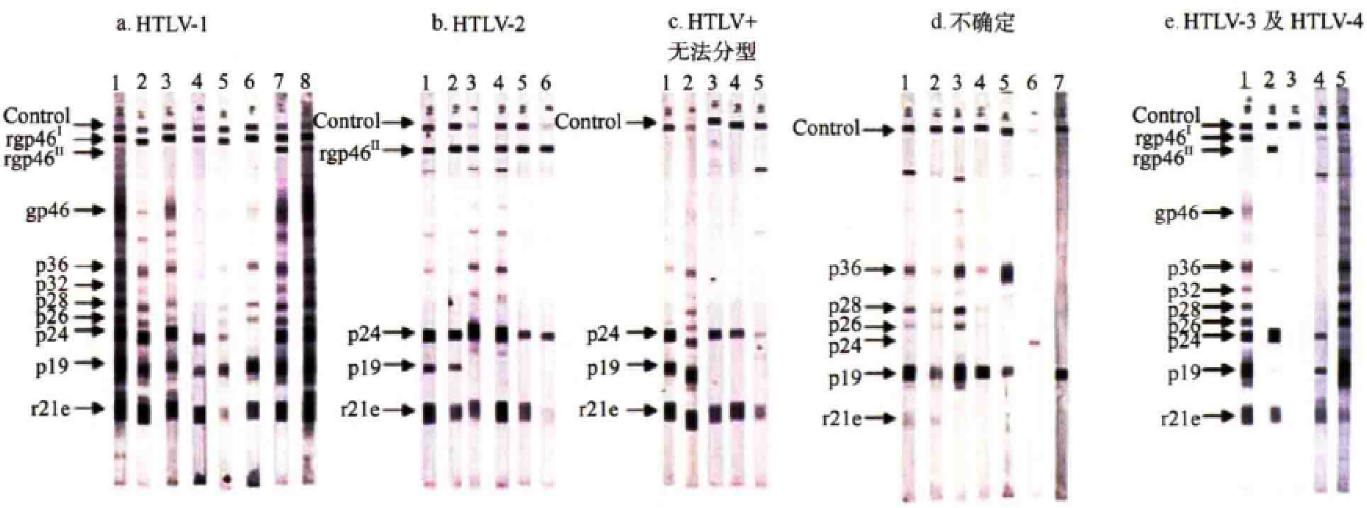


图 85-3

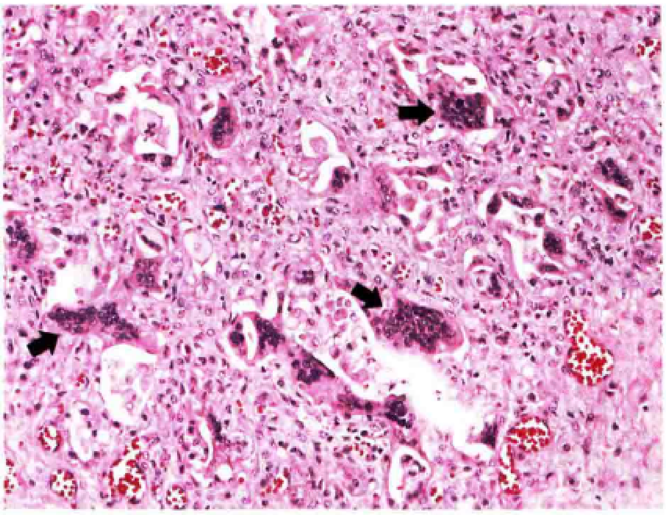


图 87-2



图 87-3

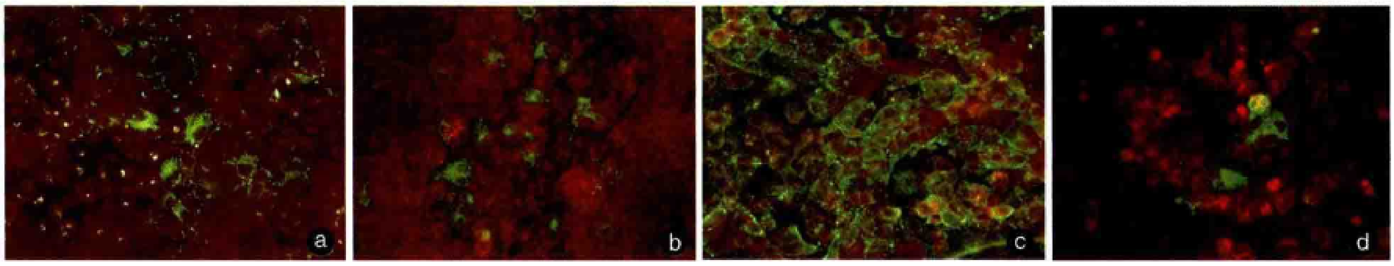


图 87-4

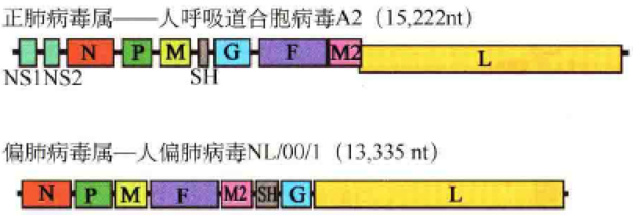


图 88-1

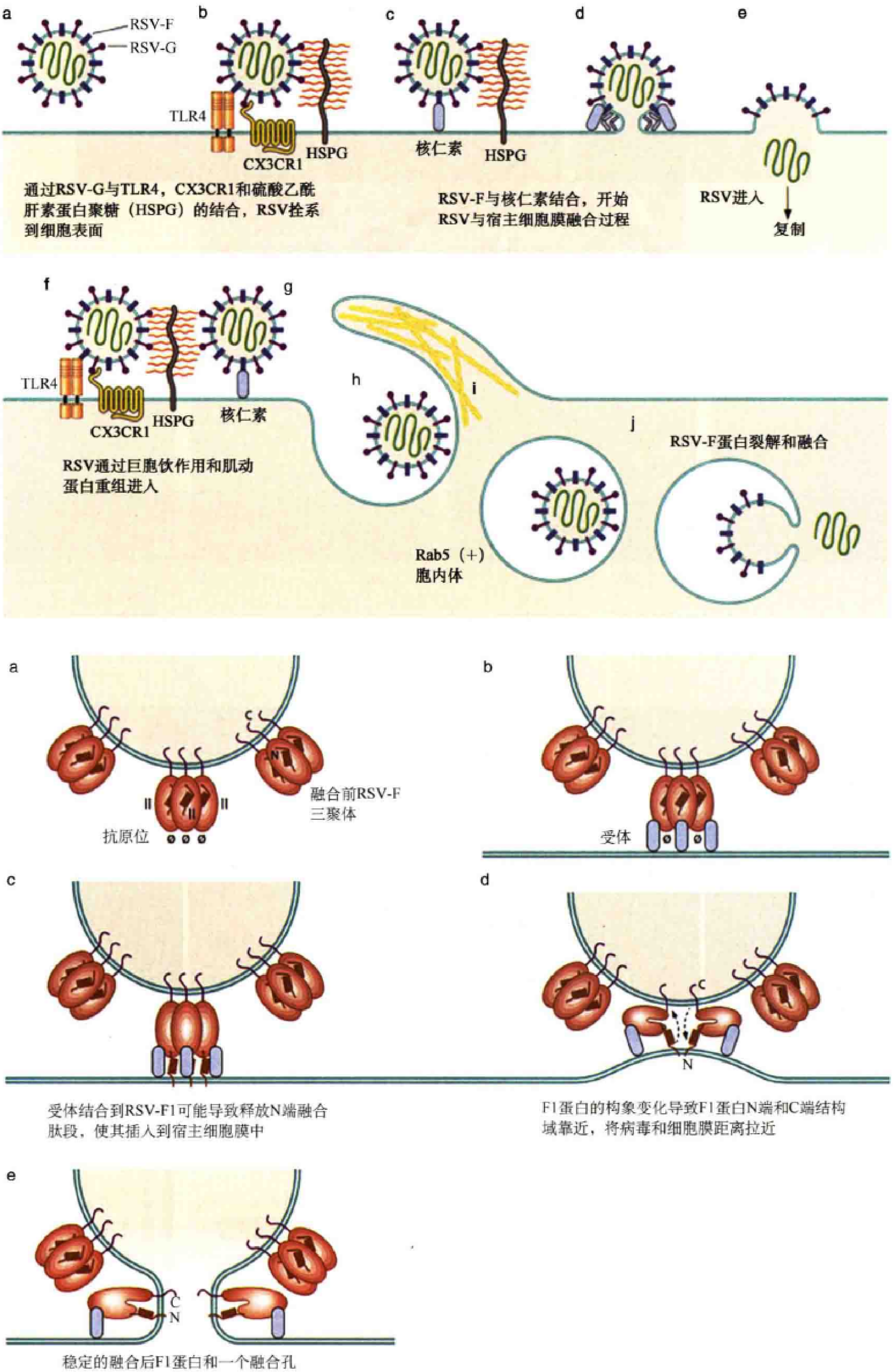

a
RSV-F
RSV-G
b
TLR4
CX3CR1
HSPG
c
核仁素
HSPG
d
e
通过RSV-G与TLR4，CX3CR1和硫酸乙酰肝素蛋白聚糖（HSPG）的结合，RSV拴系到细胞表面
RSV-F与核仁素结合，开始RSV与宿主细胞膜融合过程
RSV进入
复制
f
g
TLR4
CX3CR1
HSPG
核仁素
h
i
j
RSV通过巨胞饮作用和肌动蛋白重组进入
RSV-F蛋白裂解和融合
Rab5（+）胞内体
a
C
N
融合前RSV-F三聚体
抗原位
b
受体
c
d
C
N
受体结合到RSV-F1可能导致释放N端融合肽段，使其插入到宿主细胞膜中
F1蛋白的构象变化导致F1蛋白N端和C端结构域靠近，将病毒和细胞膜距离拉近
e
C
N
稳定的融合后F1蛋白和一个融合孔

图 88-2

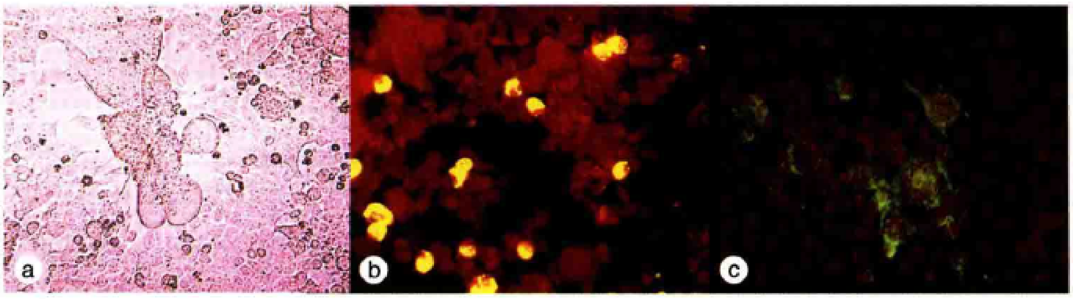


图 88-3

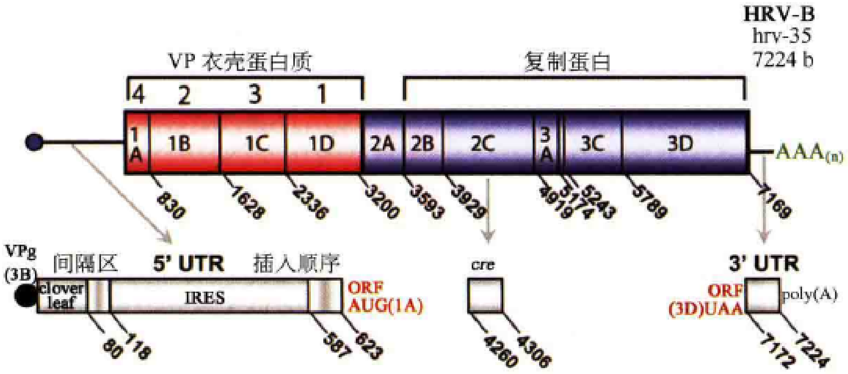


图 91-1

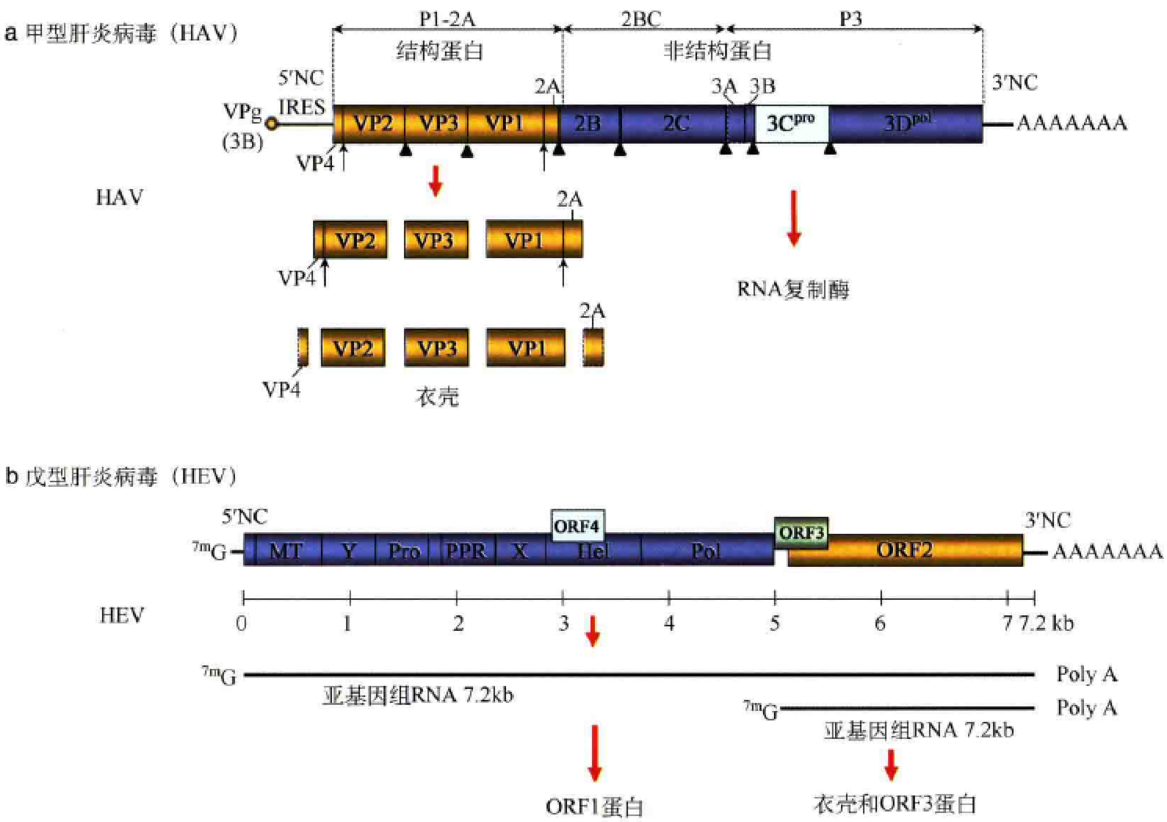
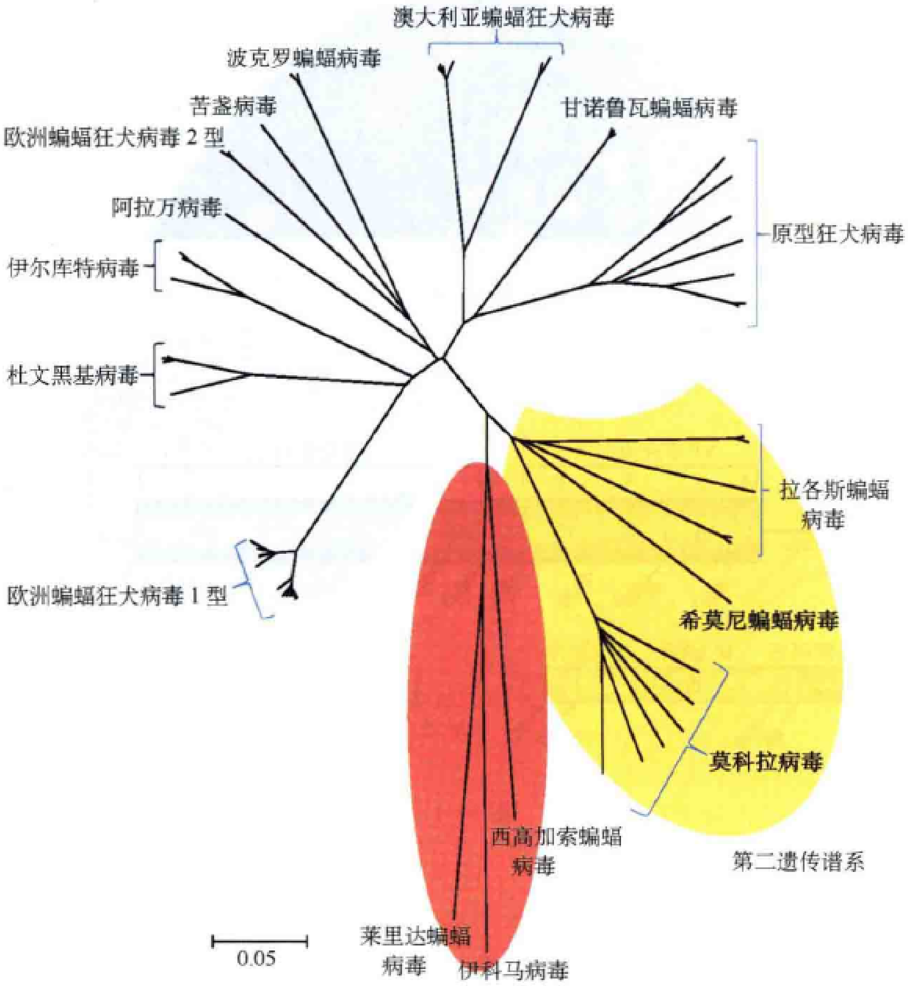
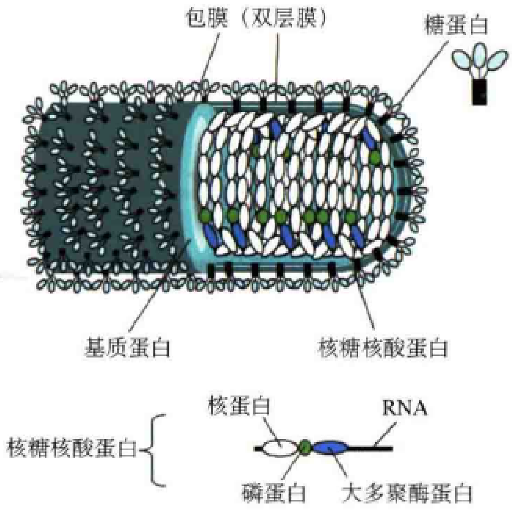


图 93-1



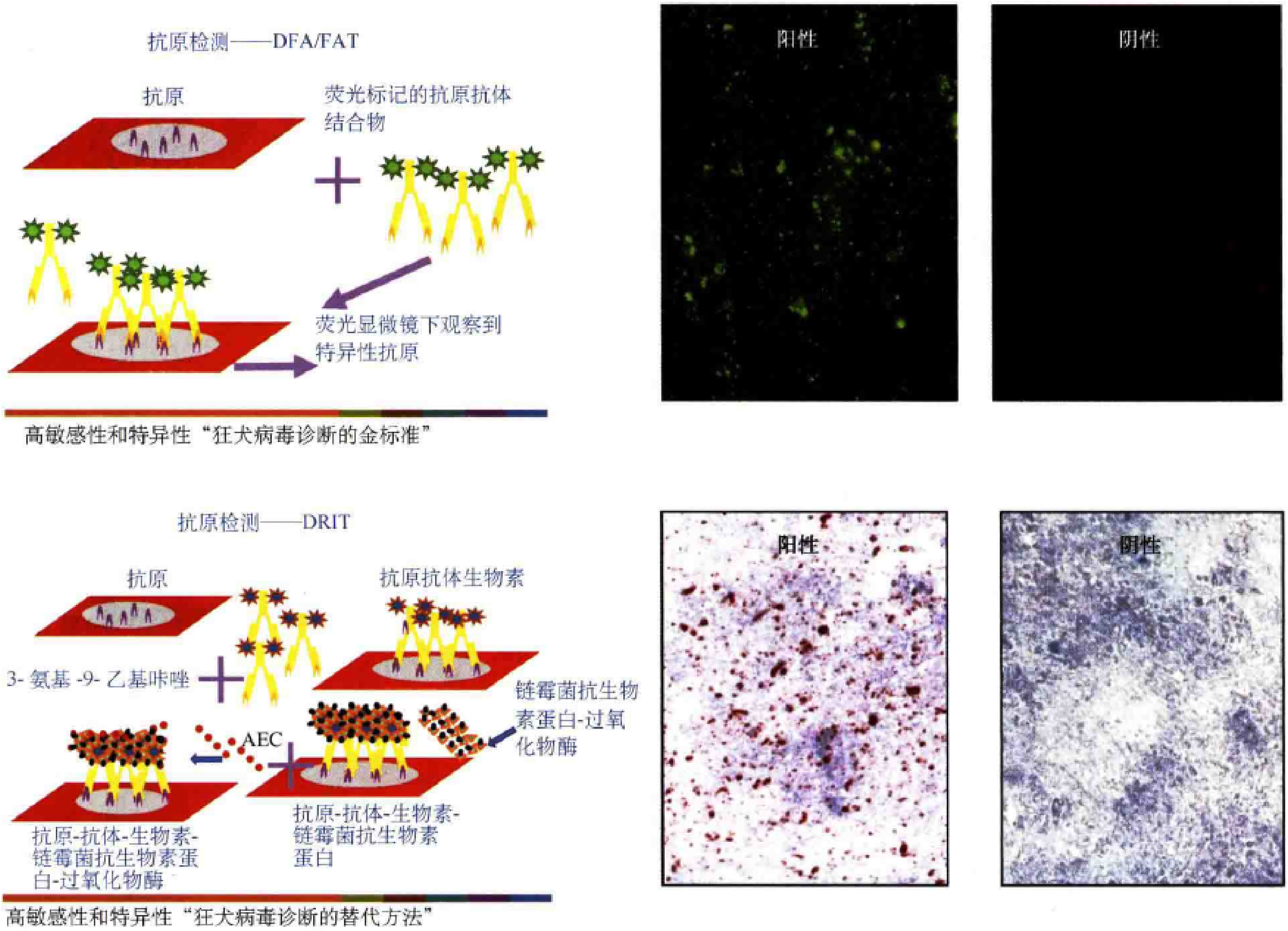
第一遗传谱系
澳大利亚蝙蝠狂犬病毒
波克罗蝙蝠病毒
苦盏病毒
甘诺鲁瓦蝙蝠病毒
欧洲蝙蝠狂犬病毒 2 型
阿拉万病毒
原型狂犬病毒
伊尔库特病毒
杜文黑基病毒
拉各斯蝙蝠病毒
欧洲蝙蝠狂犬病毒 1 型
希莫尼蝙蝠病毒
莫科拉病毒
西高加索蝙蝠病毒
第二遗传谱系
0.05
莱里达蝙蝠病毒
伊科马病毒
第三遗传谱系

图 96-1



包膜（双层膜）
糖蛋白
基质蛋白
核糖核酸蛋白
核蛋白
RNA
核糖核酸蛋白
磷蛋白
大多聚酶蛋白

图 96-2



抗原检测——DFA/FAT
抗原
荧光标记的抗原抗体结合物
荧光显微镜下观察到特异性抗原
高敏感性和特异性“狂犬病毒诊断的金标准”
阳性
阴性
抗原检测——DRIT
抗原
抗原抗体生物素
3-氨基-9-乙基咔唑
链霉菌抗生物素蛋白-过氧化物酶
AEC
抗原-抗体-生物素-链霉菌抗生物素蛋白-过氧化物酶
抗原-抗体-生物素-链霉菌抗生物素蛋白
高敏感性和特异性“狂犬病毒诊断的替代方法”
阳性
阴性

图 96-3

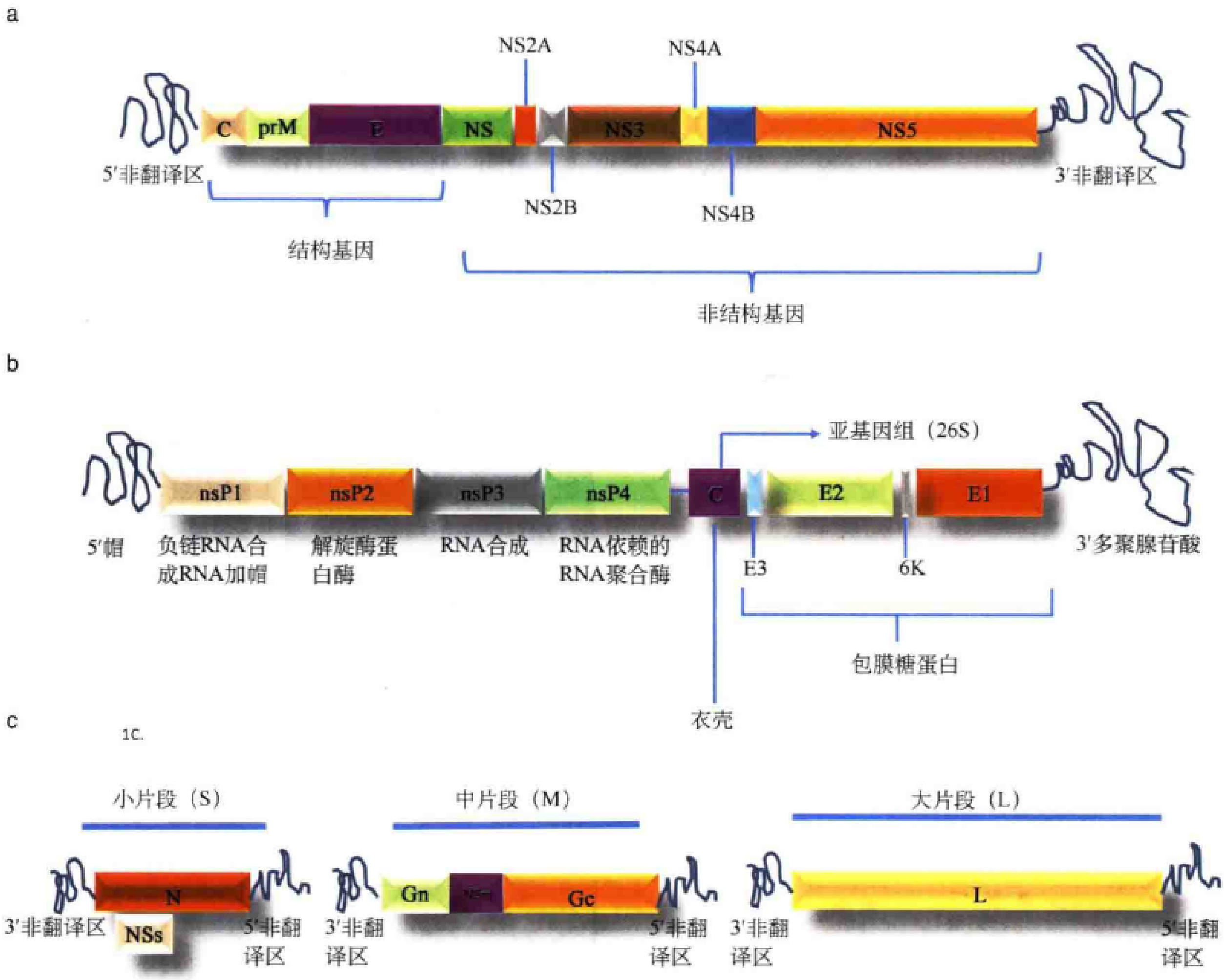


图 97-1

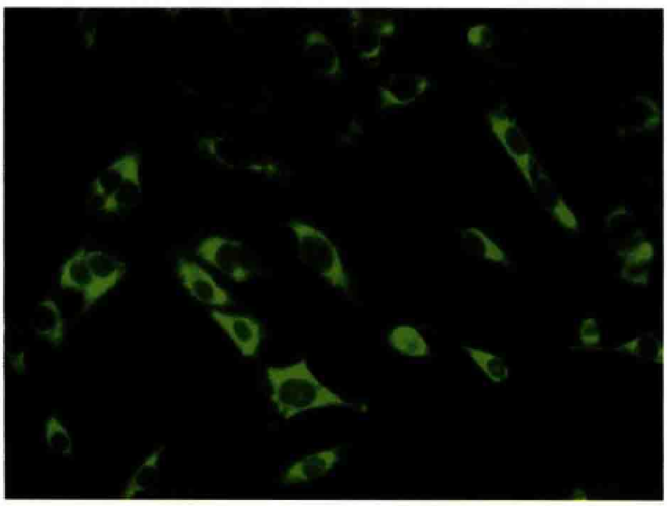


图 97-3

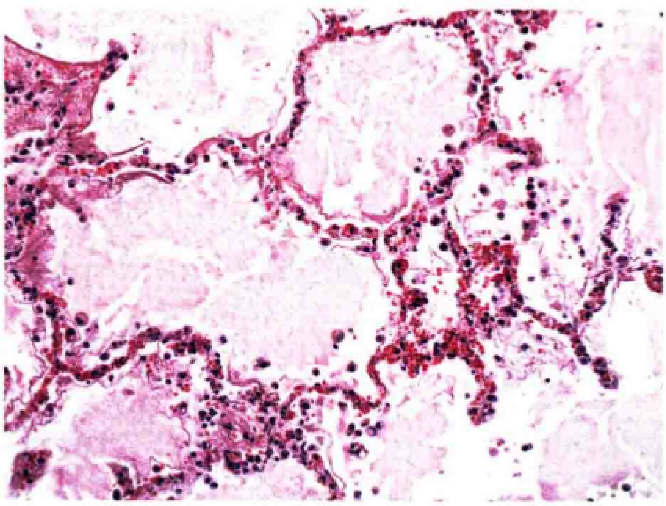


图 98-2

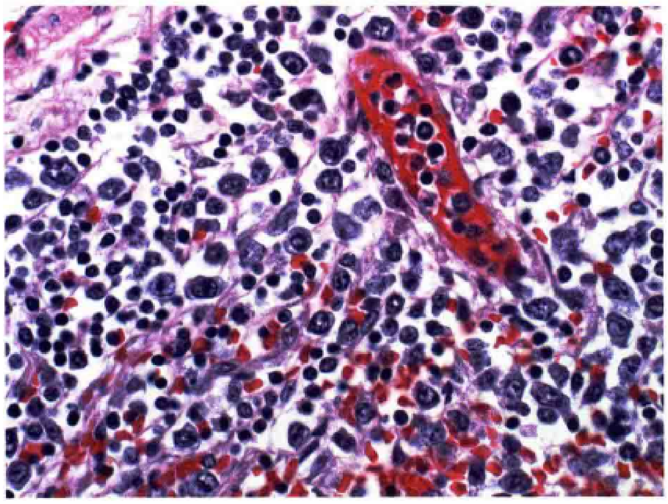


图 98-3

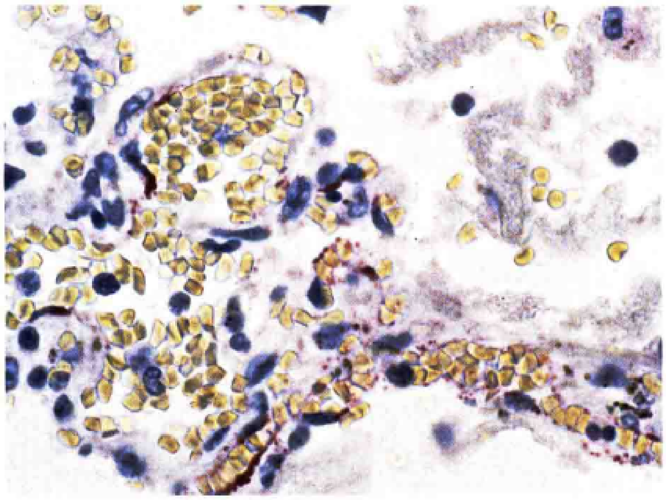


图 98-4

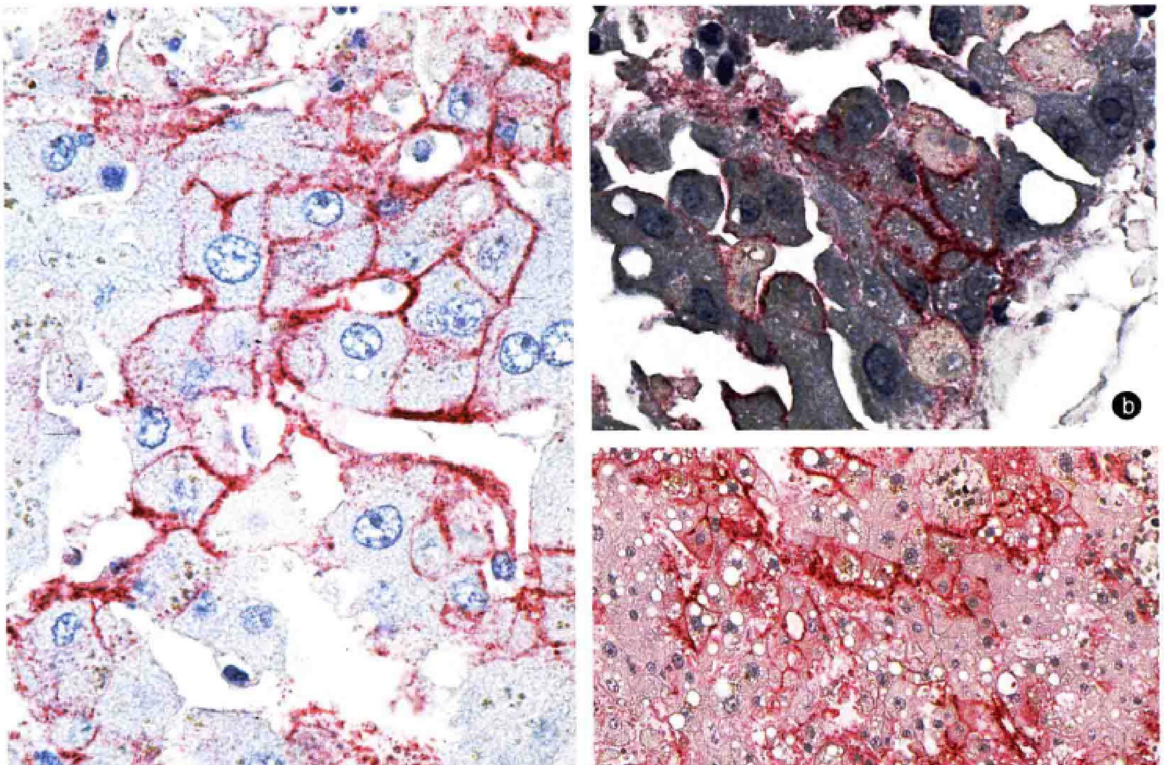


图 99-1

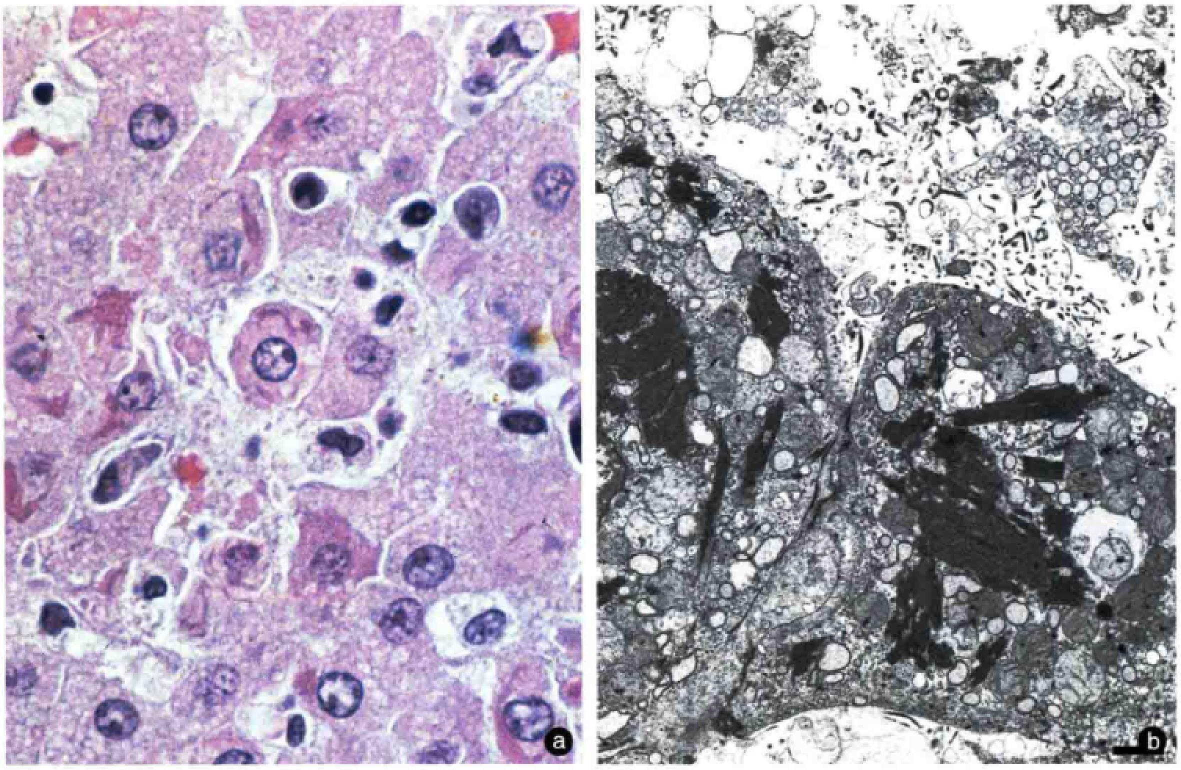


图 99-2

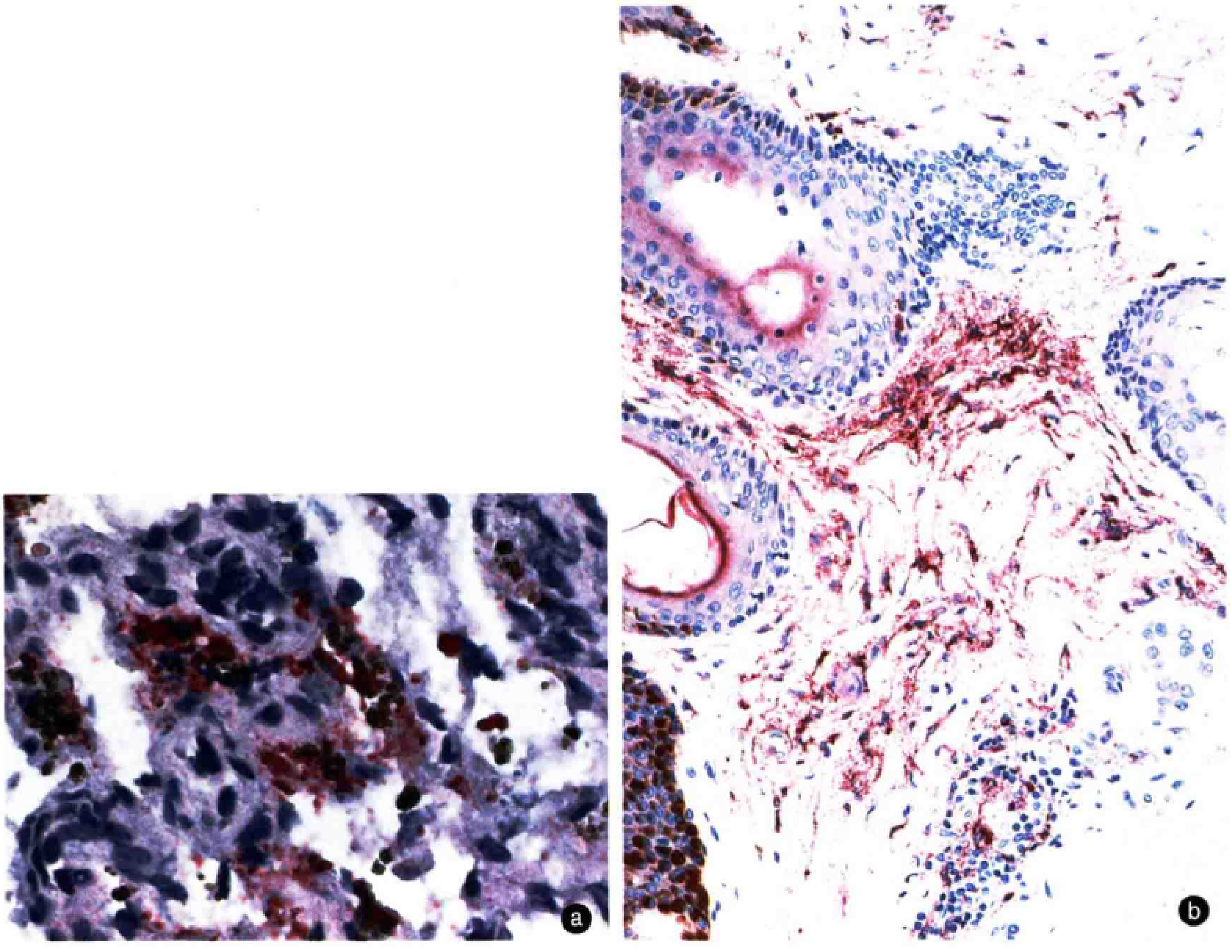


图 99-3

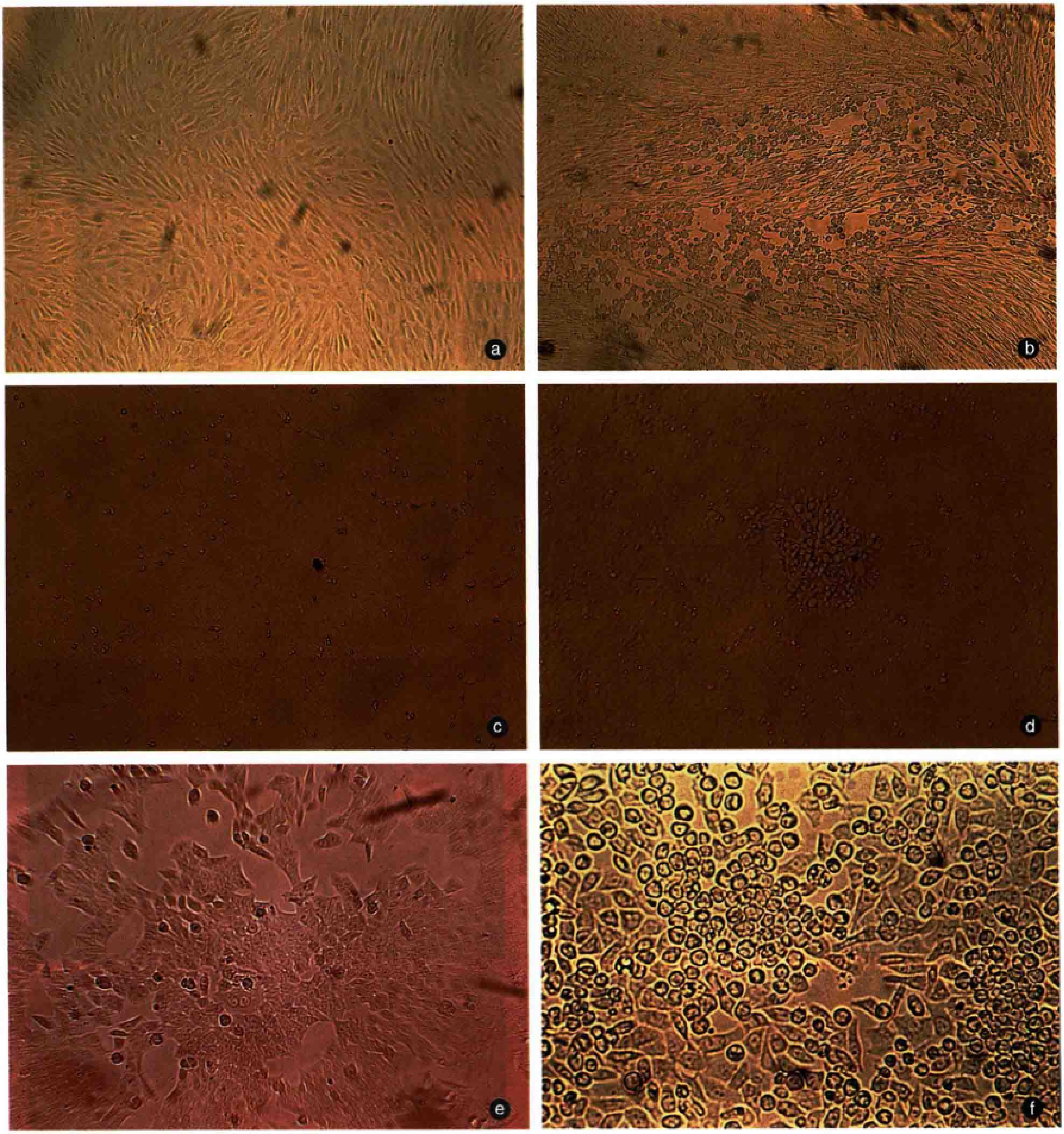


图 100-1

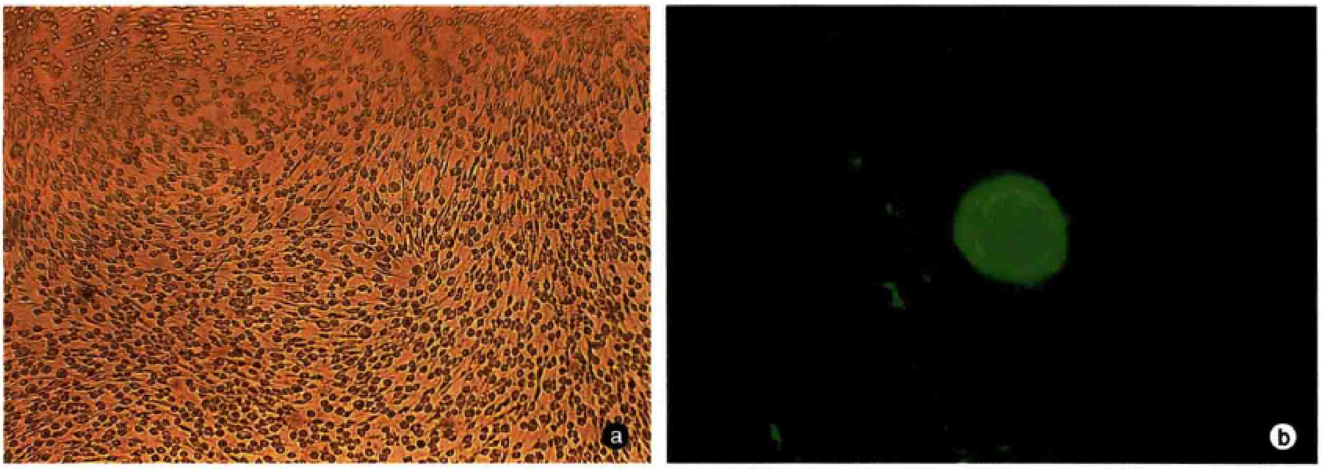


图 100-2

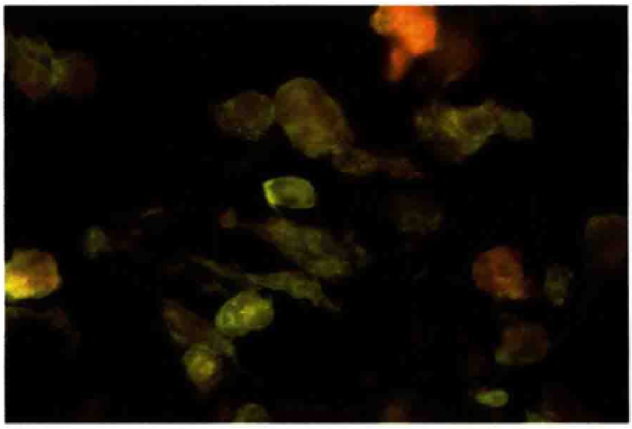


图 101-4

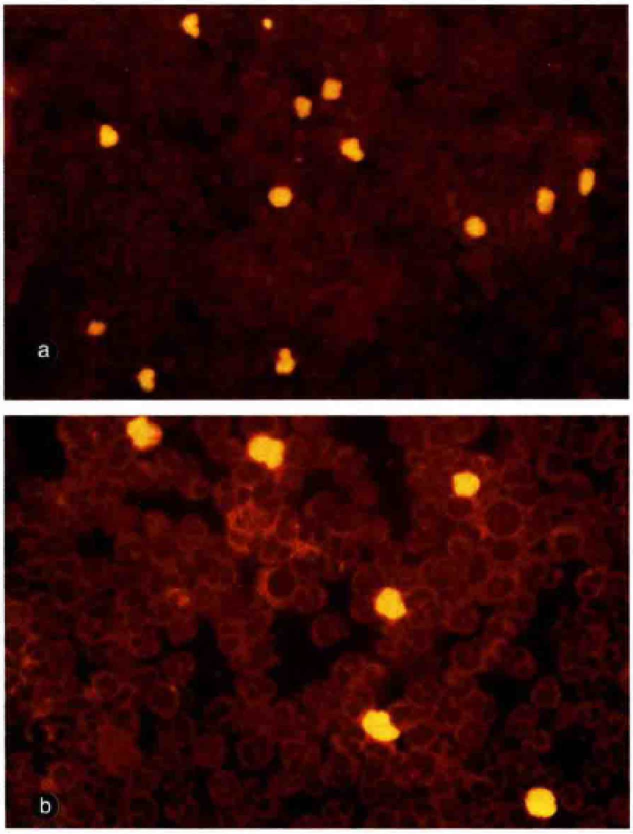


图 102-2

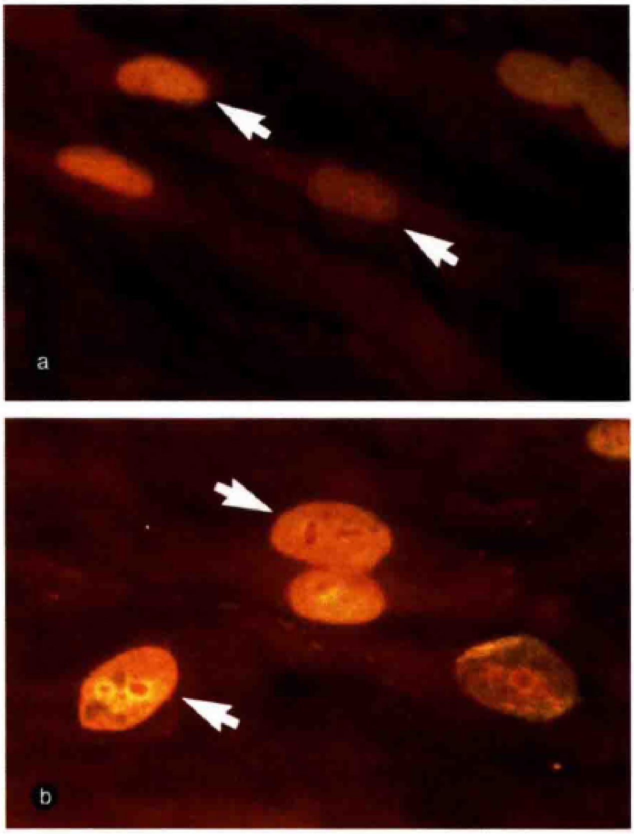


图 102-4



图 104-1



图 105-1



图 105-2

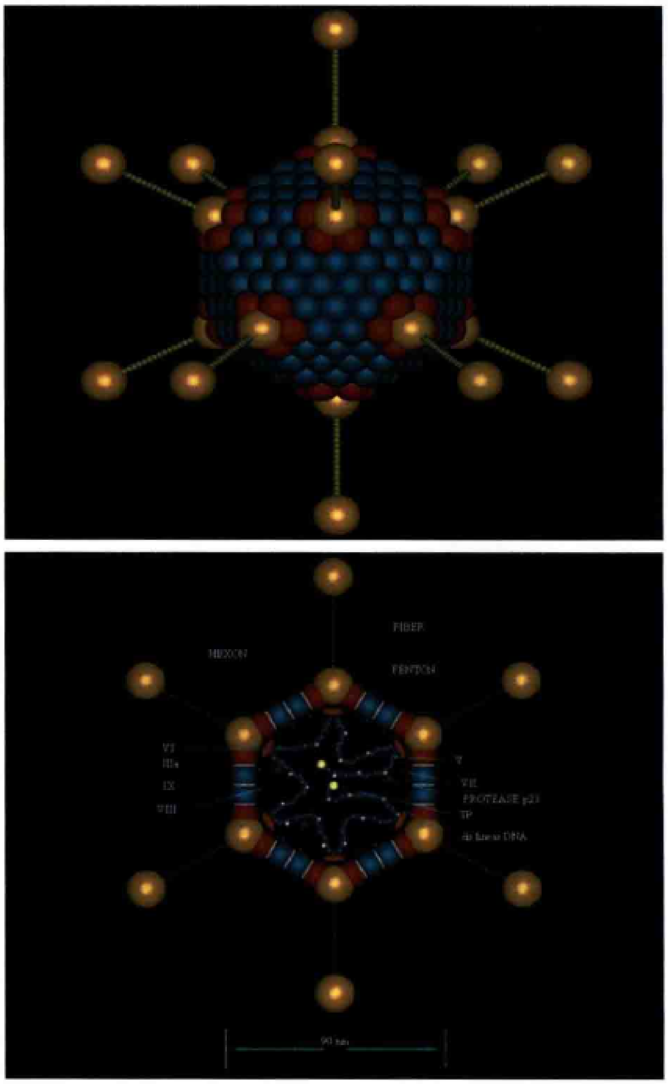


图 106-1

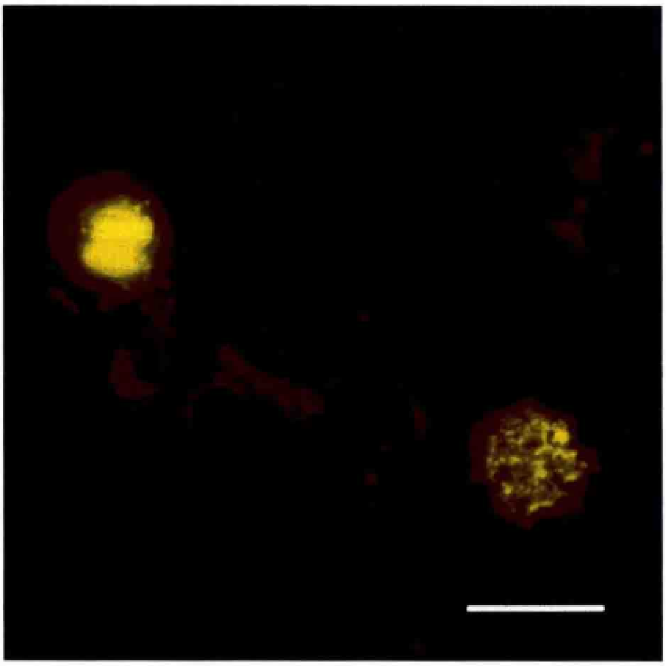


图 106-3

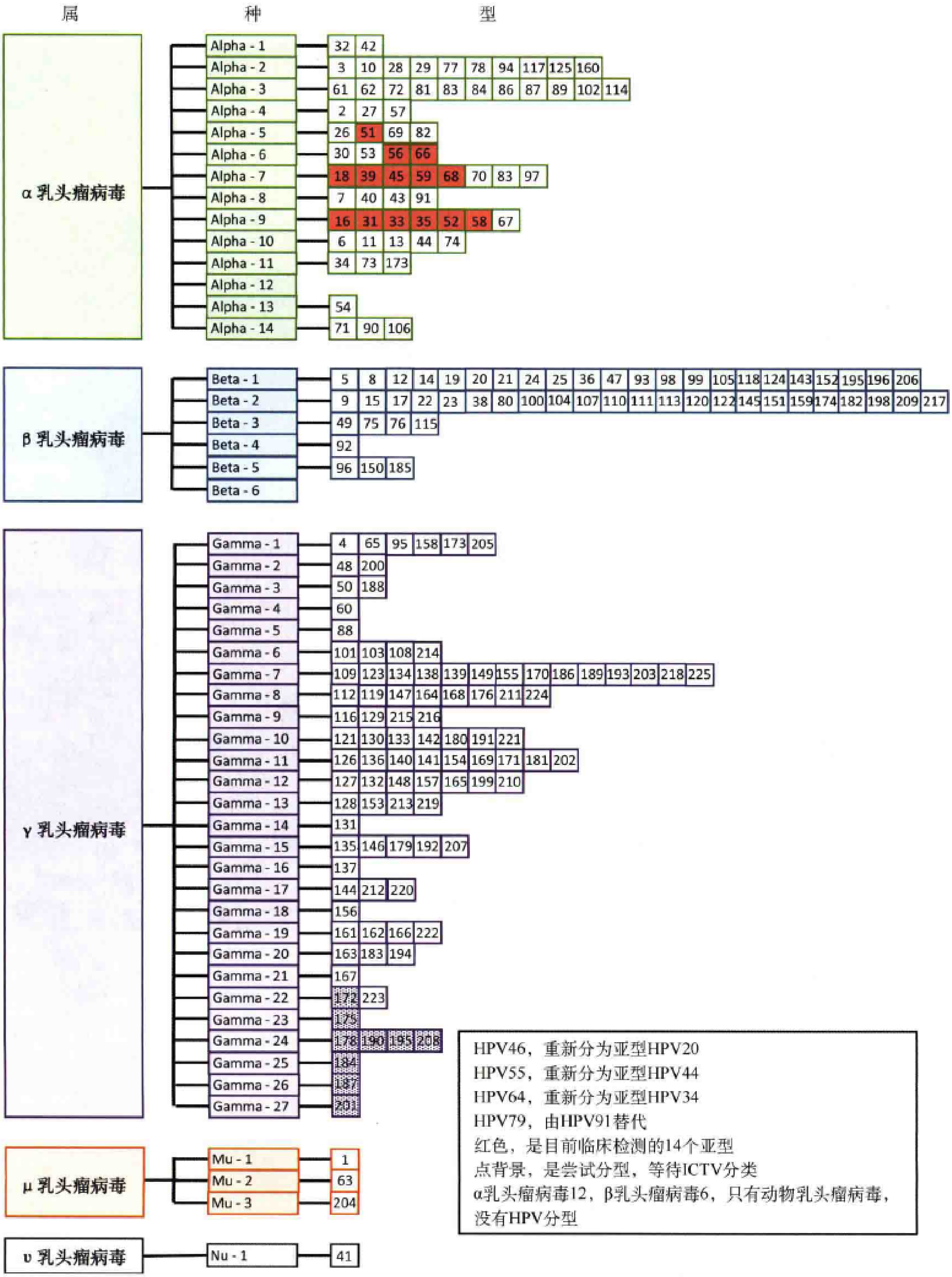

属
种
型
α 乳头瘤病毒
Alpha - 1: 32 42
Alpha - 2: 3 10 28 29 77 78 94 117 125 160
Alpha - 3: 61 62 72 81 83 84 86 87 89 102 114
Alpha - 4: 2 27 57
Alpha - 5: 26 51 69 82
Alpha - 6: 30 53 56 66
Alpha - 7: 18 39 45 59 68 70 83 97
Alpha - 8: 7 40 43 91
Alpha - 9: 16 31 33 35 52 58 67
Alpha - 10: 6 11 13 44 74
Alpha - 11: 34 73 173
Alpha - 12
Alpha - 13: 54
Alpha - 14: 71 90 106
β 乳头瘤病毒
Beta - 1: 5 8 12 14 19 20 21 24 25 36 47 93 98 99 105 118 124 143 152 195 196 206
Beta - 2: 9 15 17 22 23 38 80 100 104 107 110 111 113 120 122 145 151 159 174 182 198 209 217
Beta - 3: 49 75 76 115
Beta - 4: 92
Beta - 5: 96 150 185
Beta - 6
γ 乳头瘤病毒
Gamma - 1: 4 65 95 158 173 205
Gamma - 2: 48 200
Gamma - 3: 50 188
Gamma - 4: 60
Gamma - 5: 88
Gamma - 6: 101 103 108 214
Gamma - 7: 109 123 134 138 139 149 155 170 186 189 193 203 218 225
Gamma - 8: 112 119 147 164 168 176 211 224
Gamma - 9: 116 129 215 216
Gamma - 10: 121 130 133 142 180 191 221
Gamma - 11: 126 136 140 141 154 169 171 181 202
Gamma - 12: 127 132 148 157 165 199 210
Gamma - 13: 128 153 213 219
Gamma - 14: 131
Gamma - 15: 135 146 179 192 207
Gamma - 16: 137
Gamma - 17: 144 212 220
Gamma - 18: 156
Gamma - 19: 161 162 166 222
Gamma - 20: 163 183 194
Gamma - 21: 167
Gamma - 22: 172 223
Gamma - 23: 175
Gamma - 24: 178 190 195 208
Gamma - 25: 184
Gamma - 26: 187
Gamma - 27: 201
μ 乳头瘤病毒
Mu - 1: 1
Mu - 2: 63
Mu - 3: 204
υ 乳头瘤病毒
Nu - 1: 41
HPV46，重新分为亚型HPV20
HPV55，重新分为亚型HPV44
HPV64，重新分为亚型HPV34
HPV79，由HPV91替代
红色，是目前临床检测的14个亚型
点背景，是尝试分型，等待ICTV分类
α乳头瘤病毒12，β乳头瘤病毒6，只有动物乳头瘤病毒，
没有HPV分型

图 107-1

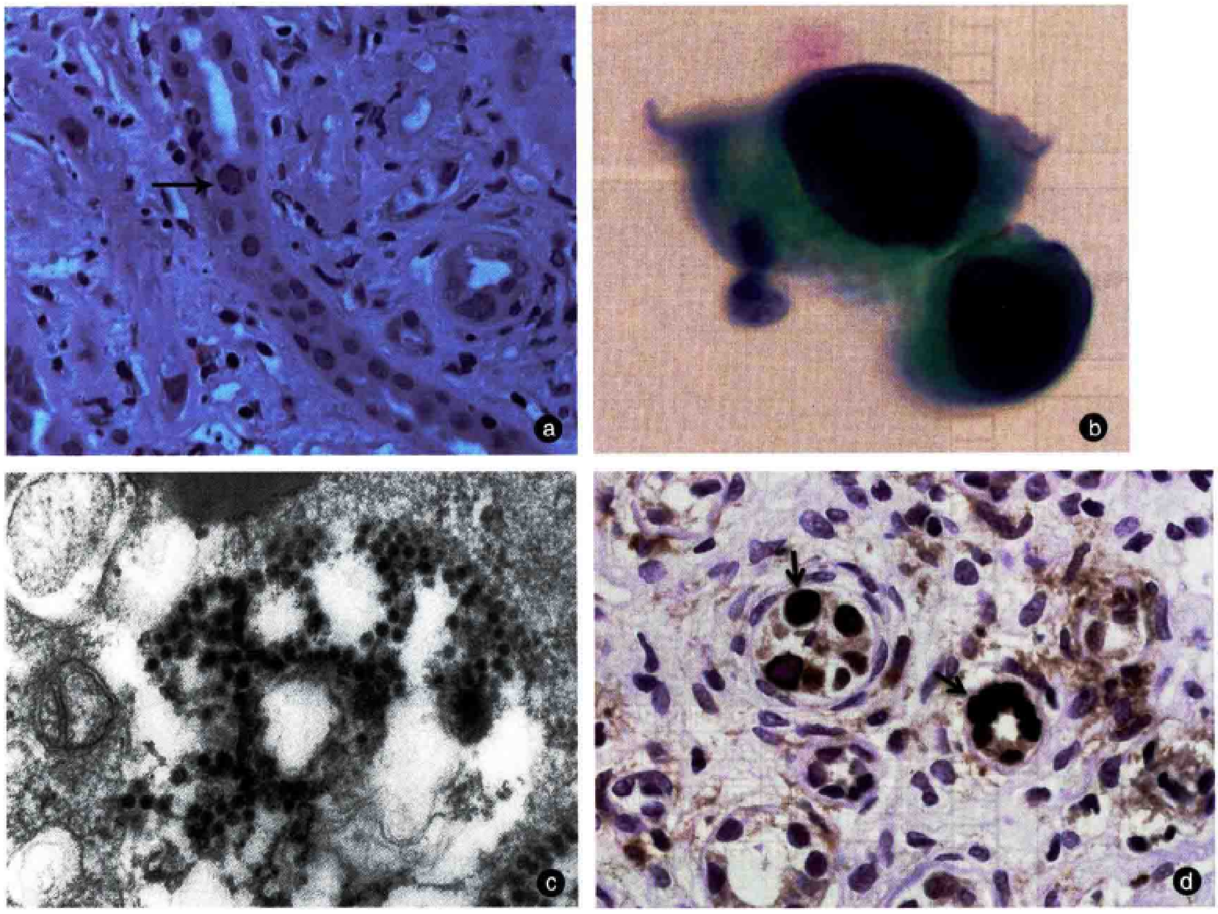


图 108-2

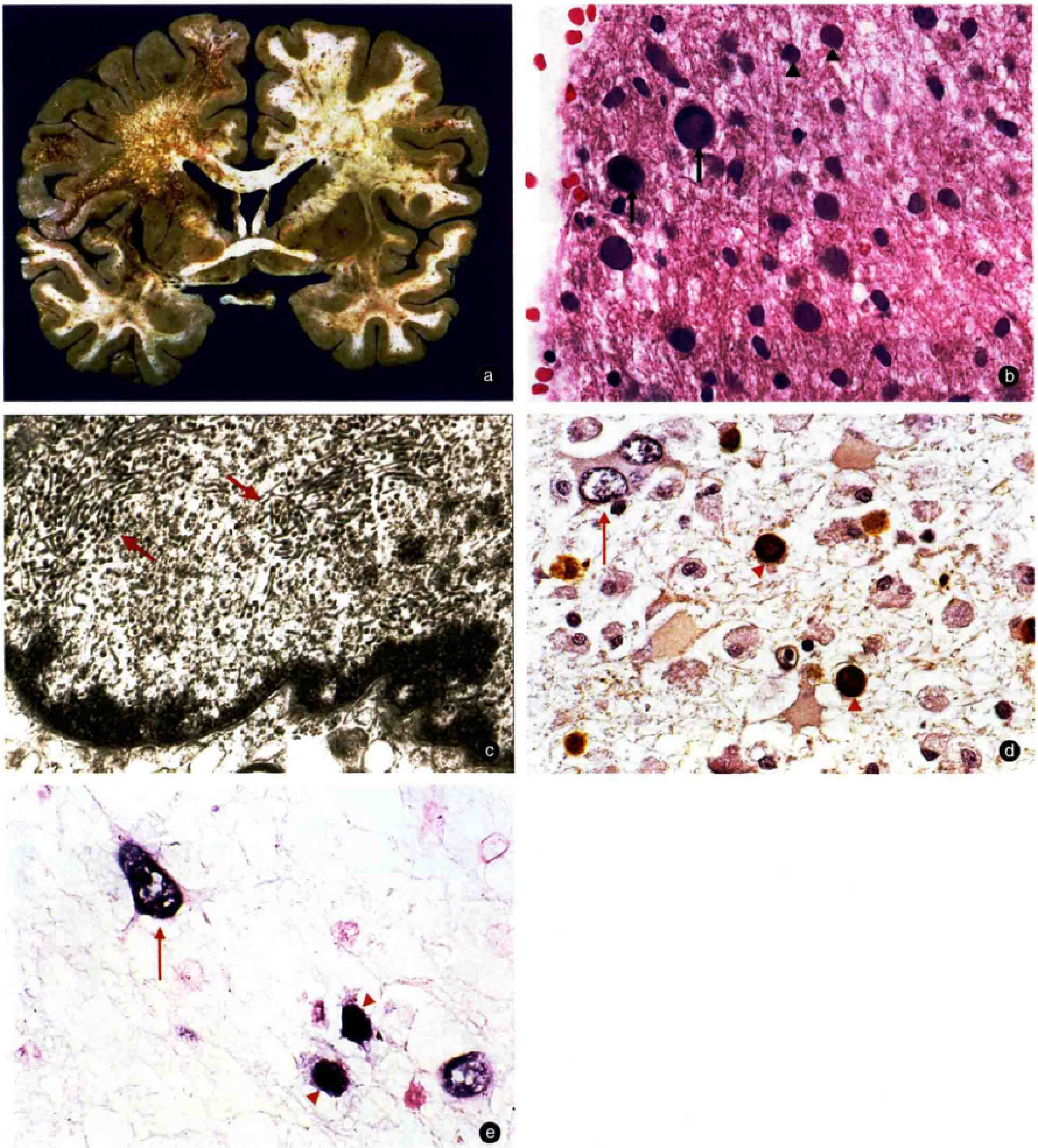


图 108-3

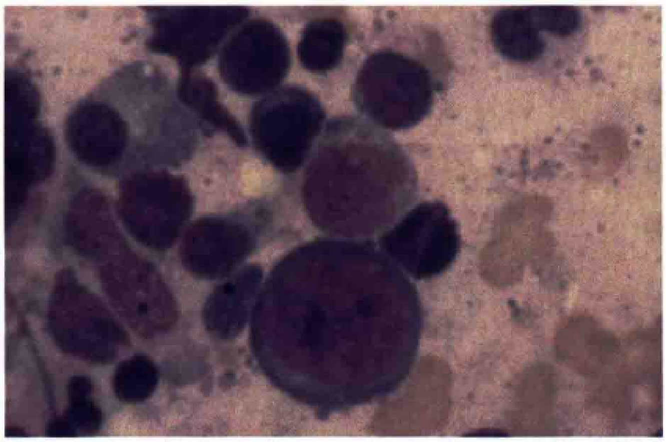


图 109-3

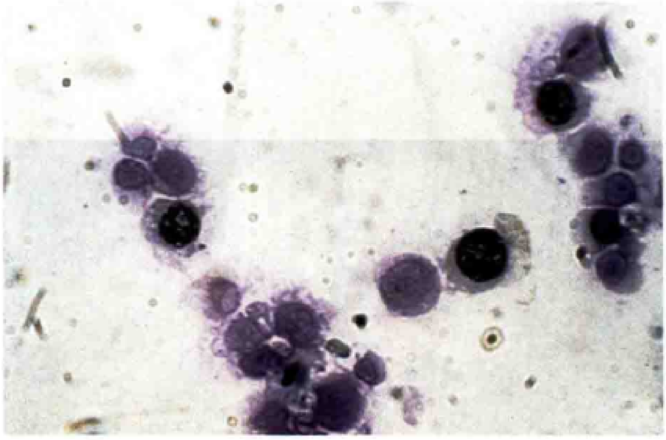


图 109-4

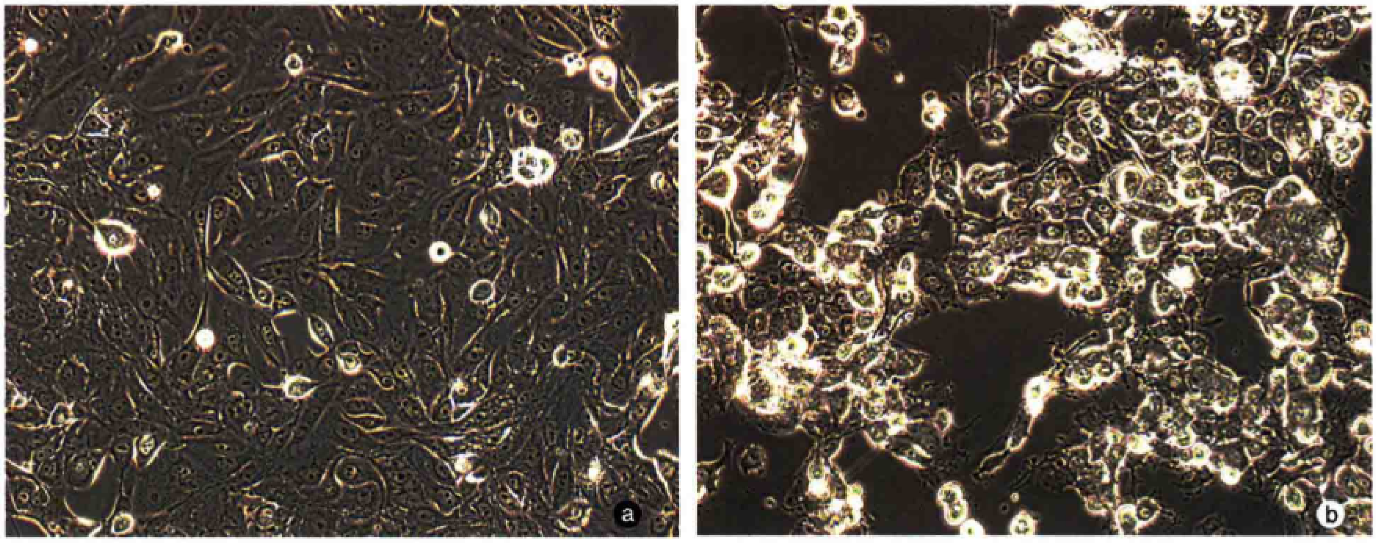


图 110-2

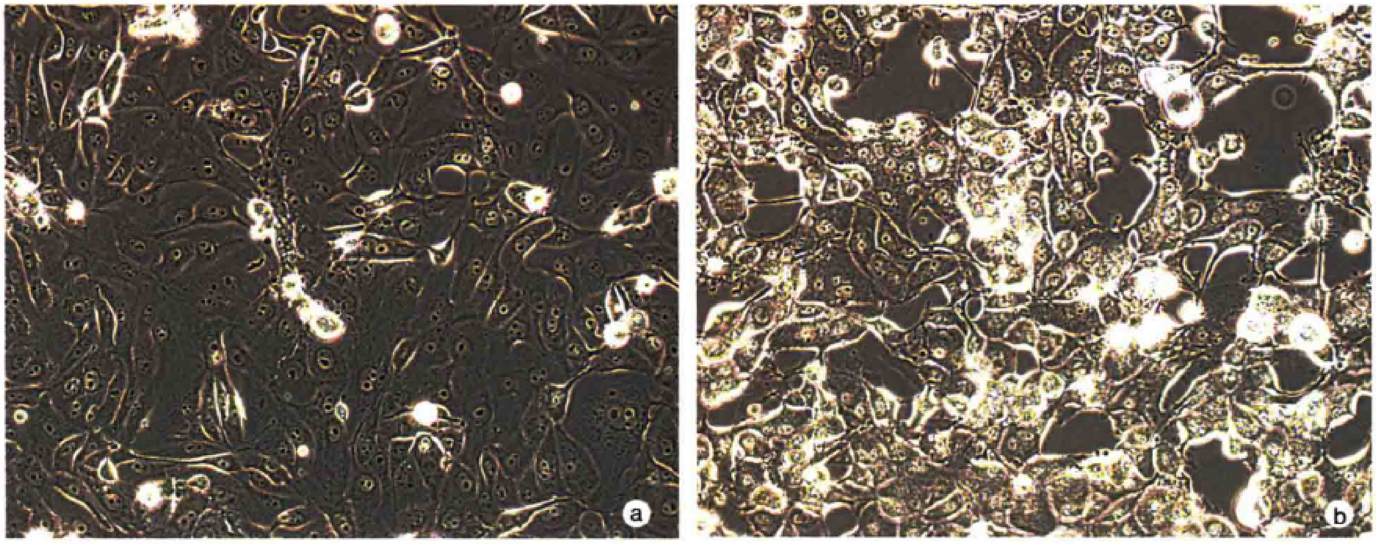


图 110-3

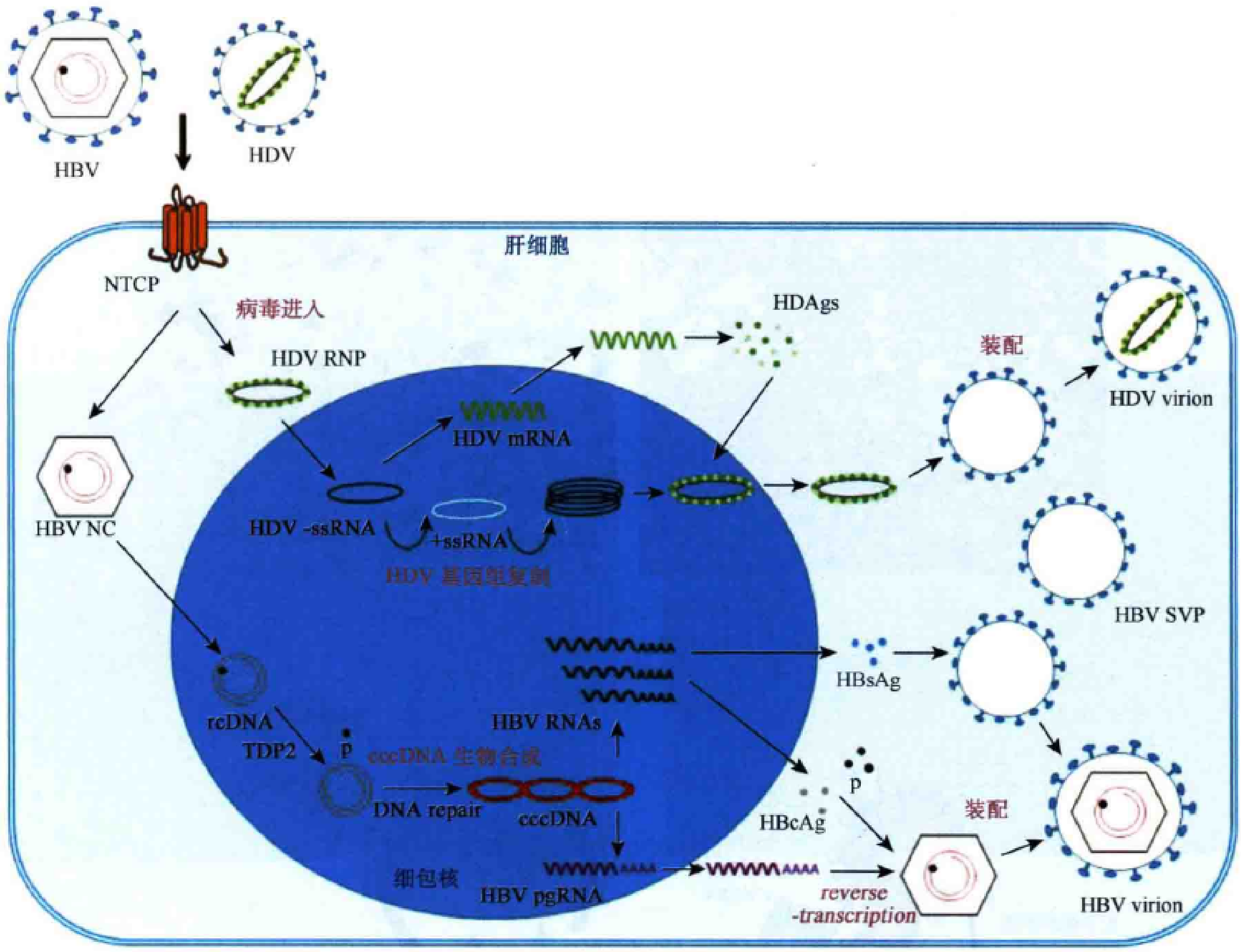

HBV
HDV
NTCP
肝细胞
病毒进入
HDV RNP
HDAgs
装配
HDV virion
HDV mRNA
HBV NC
HDV -ssRNA
+ssRNA
HDV 基因组复制
HBV SVP
HBsAg
rcDNA
TDP2
P
HBV RNAs
cccDNA 生物合成
DNA repair
cccDNA
HBcAg
P
装配
细包核
HBV pgRNA
reverse
-transcription
HBV virion

图 111-2

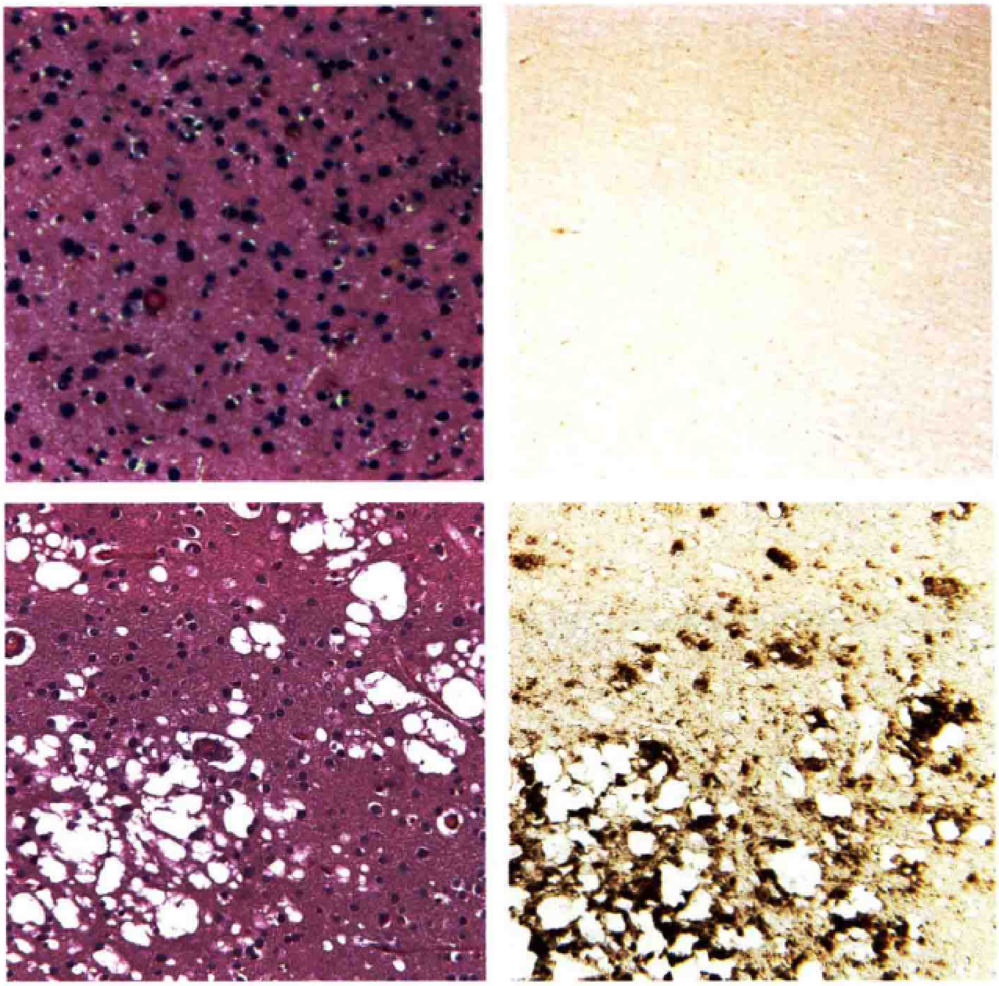


图 112-2

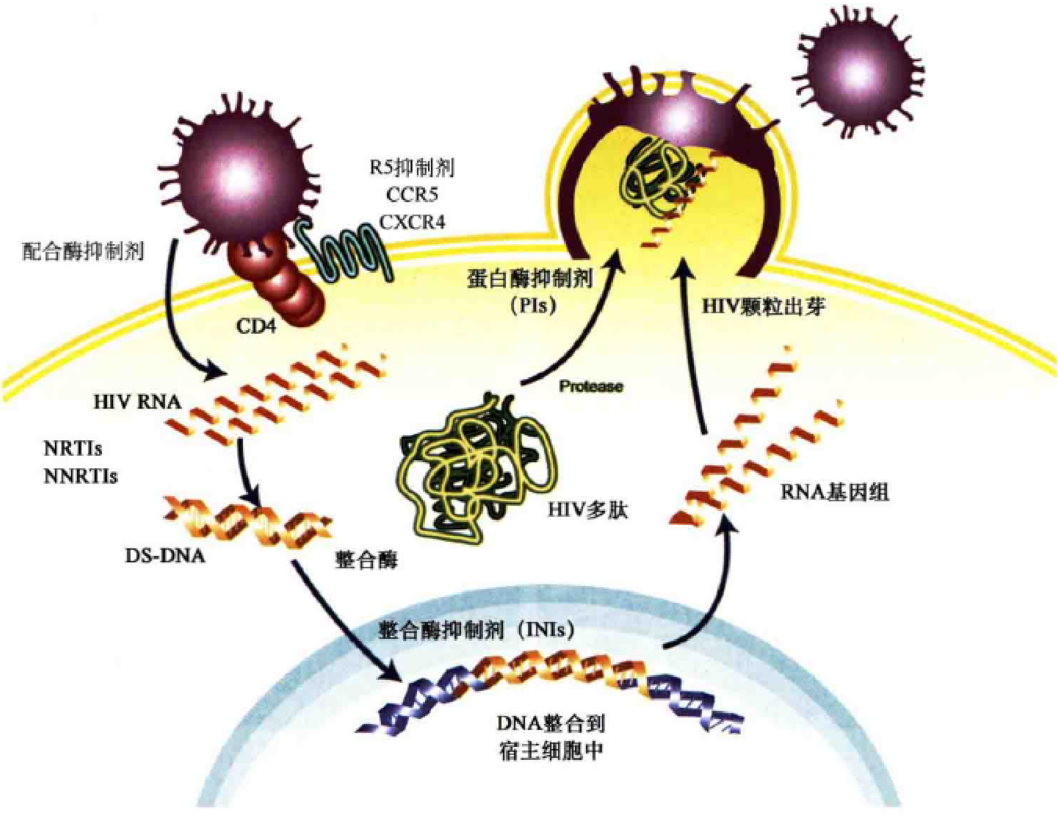

R5抑制剂
CCR5
CXCR4
配合酶抑制剂
CD4
蛋白酶抑制剂
(PIs)
HIV颗粒出芽
Protease
HIV RNA
NRTIs
NNRTIs
HIV多肽
RNA基因组
DS-DNA
整合酶
整合酶抑制剂（INIs)
DNA整合到
宿主细胞中

图 114-1

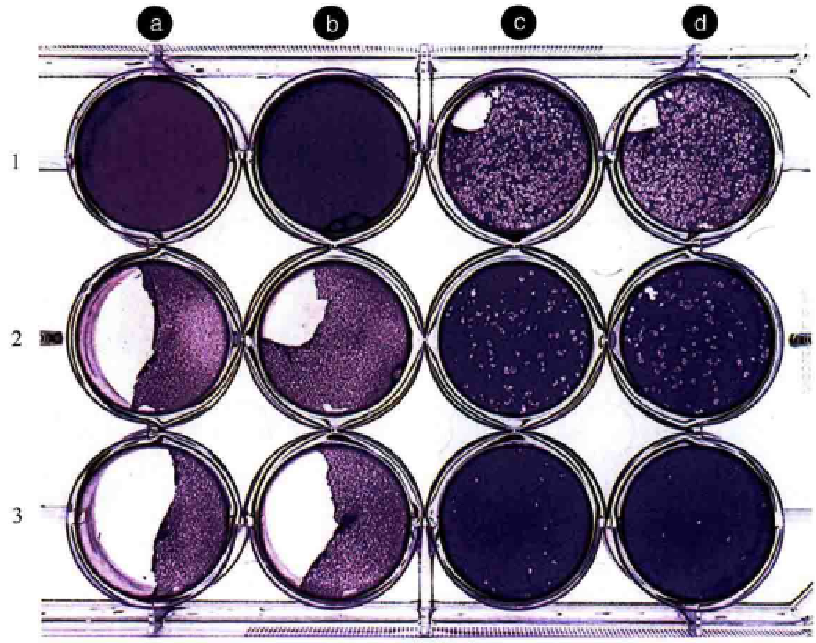


图 115-1



图 117-1



图 117-2

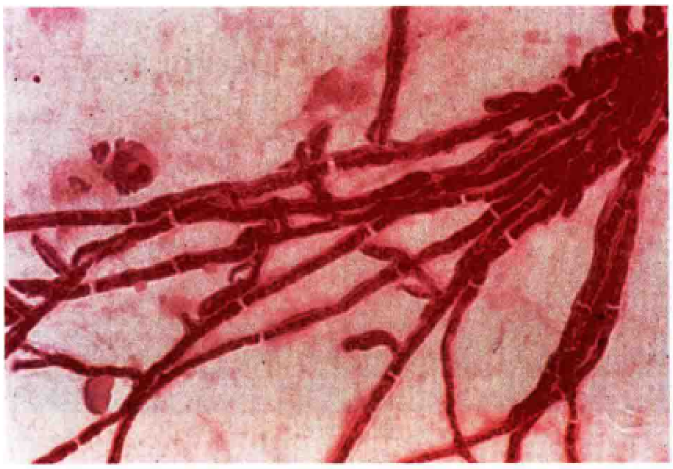


图 119-1



图 119-2



图 119-3

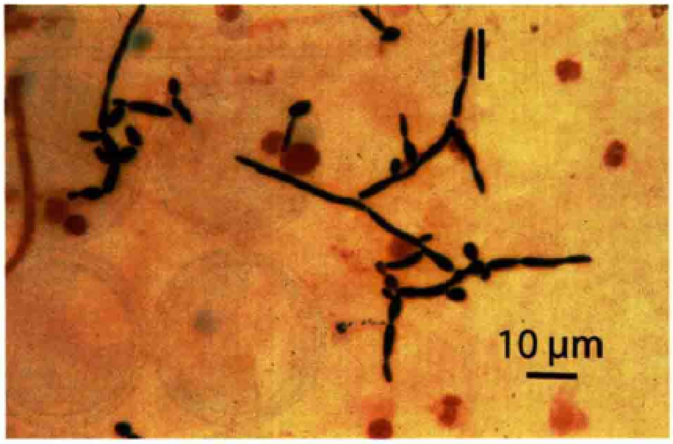


图 119-4

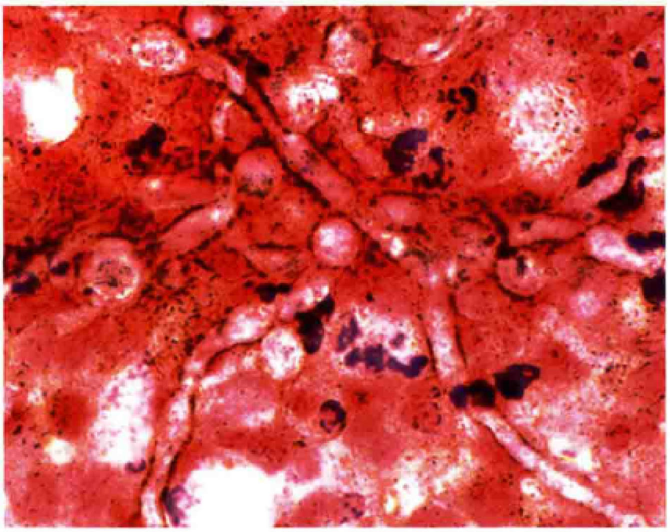


图 119-5

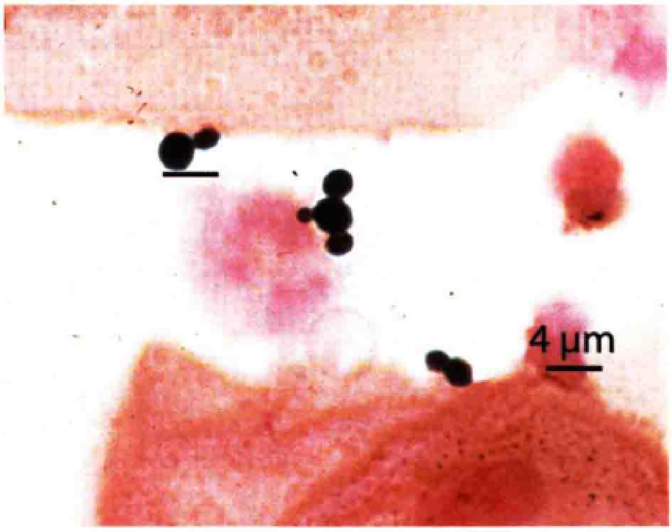


图 119-6

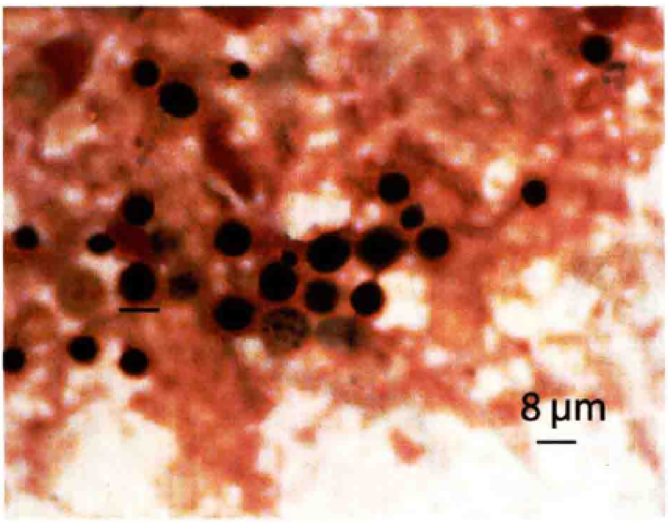


图 119-7

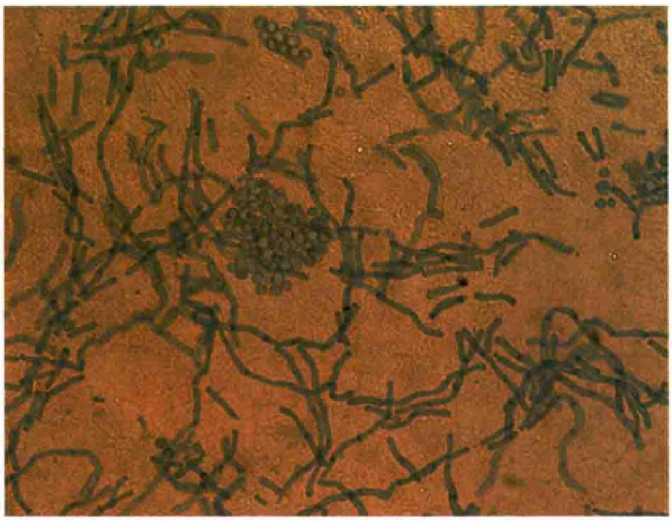


图 119-8



图 119-9

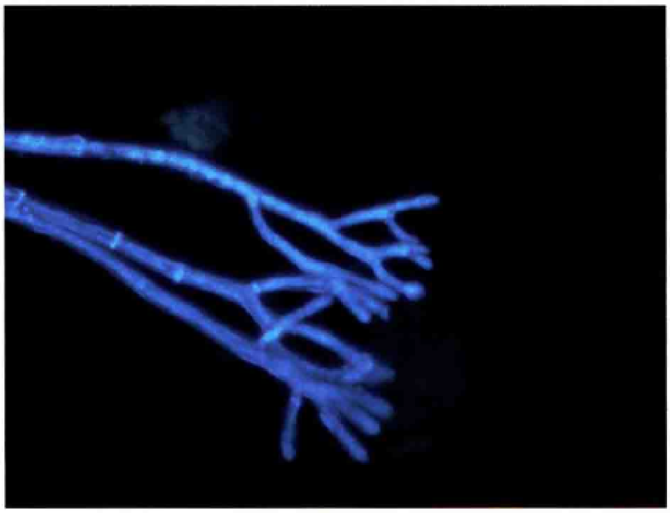


图 119-10

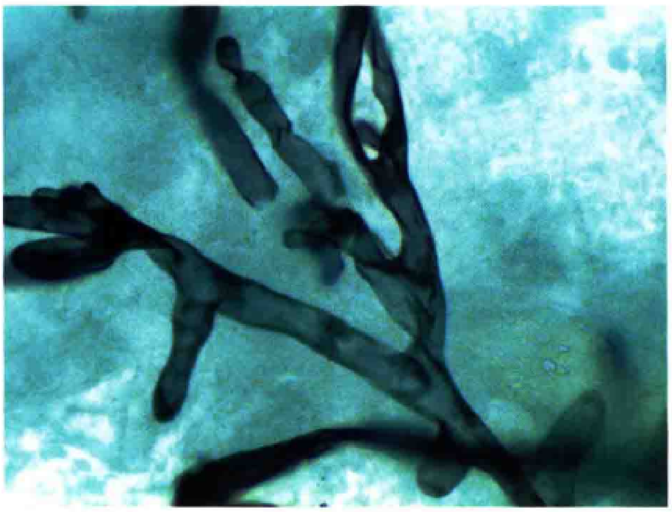


图 119-11

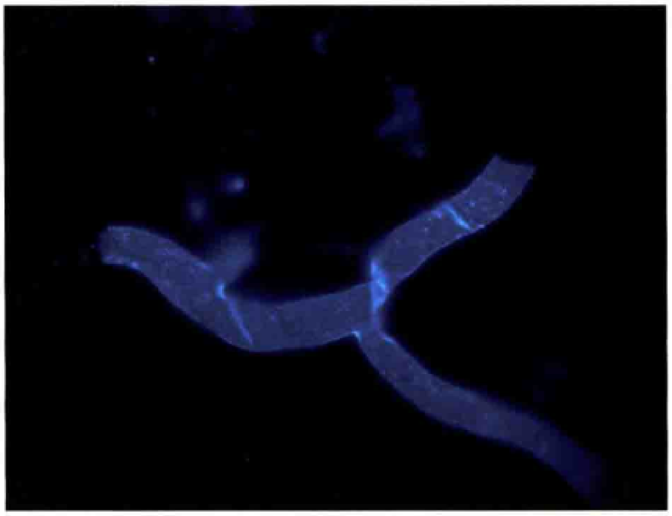


图 119-12

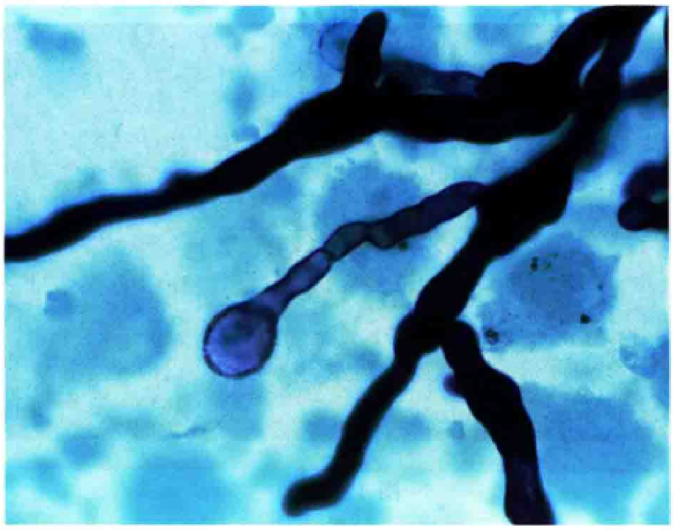


图 119-13

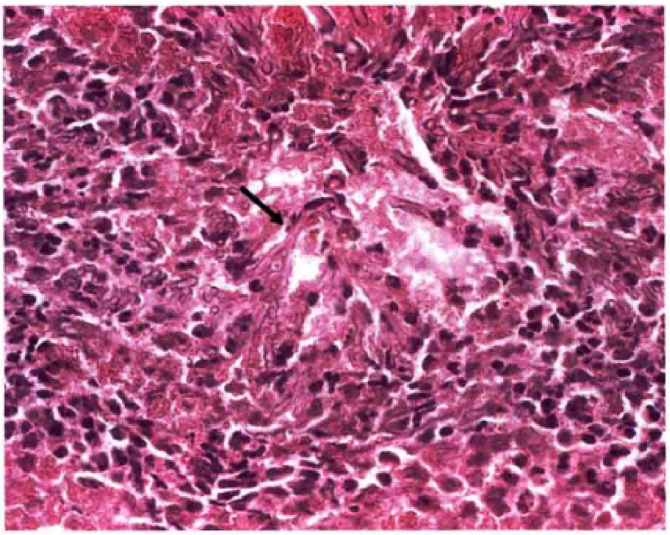


图 119-14



图 119-15

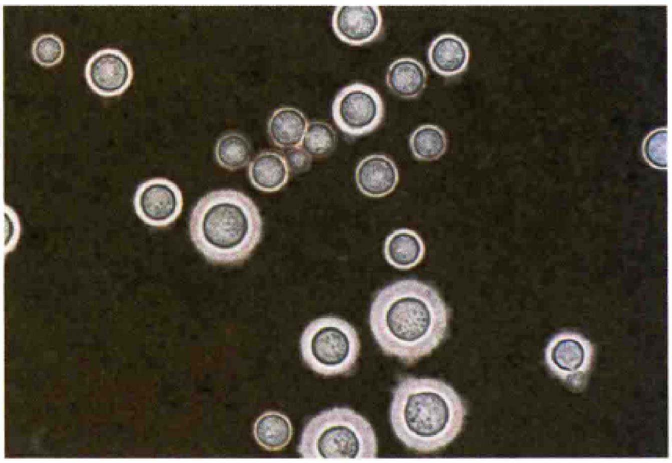


图 119-16

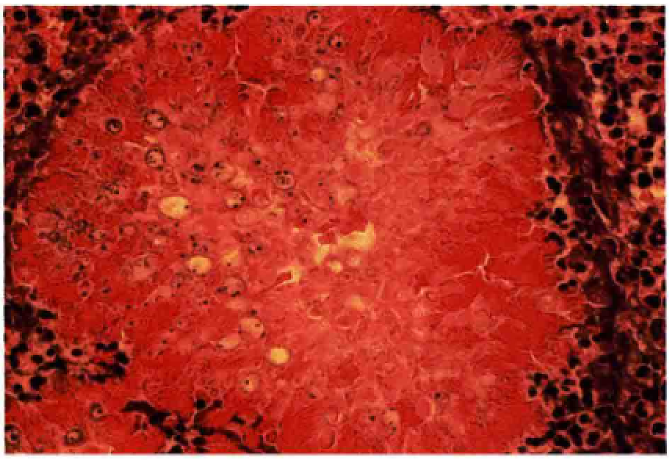


图 119-17

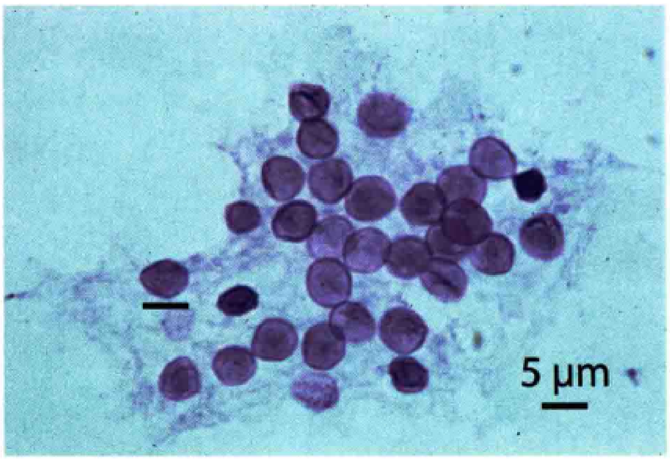


图 119-18



图 119-19

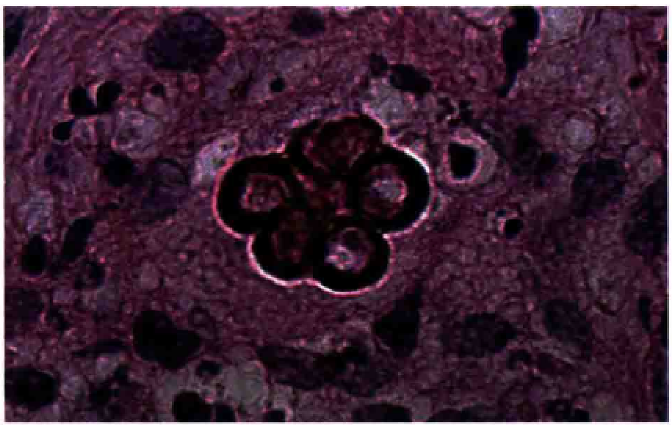


图 119-20

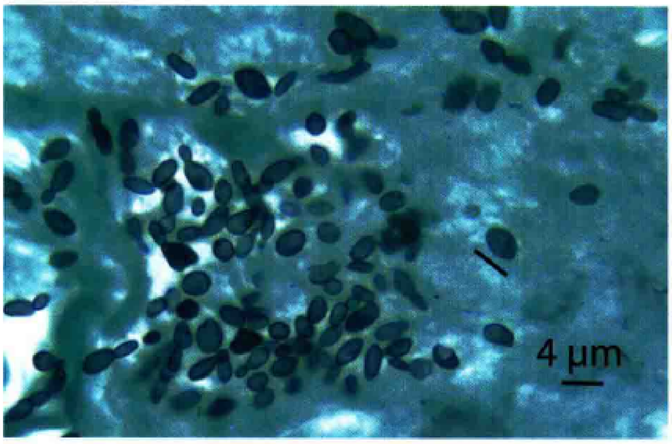


图 119-21

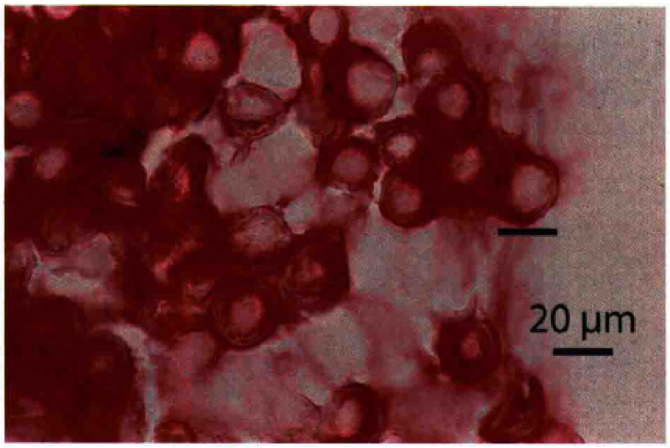


图 119-22

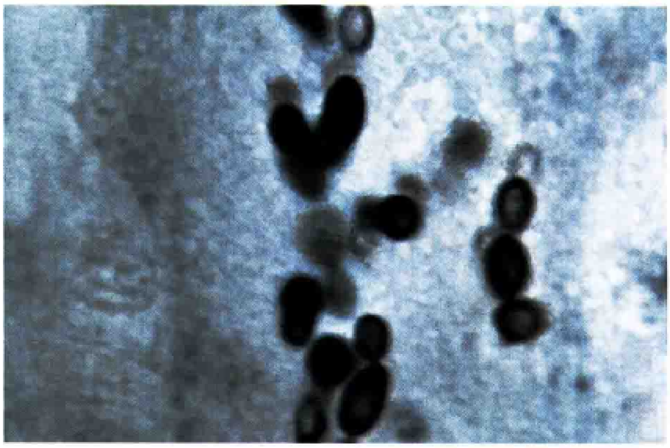


图 119-23



图 119-24

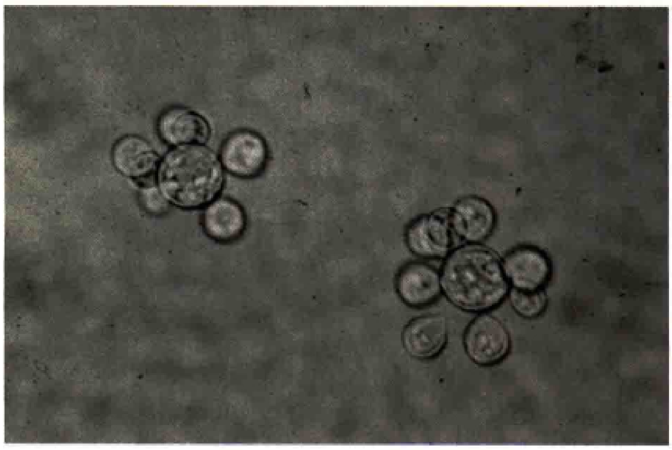


图 119-25

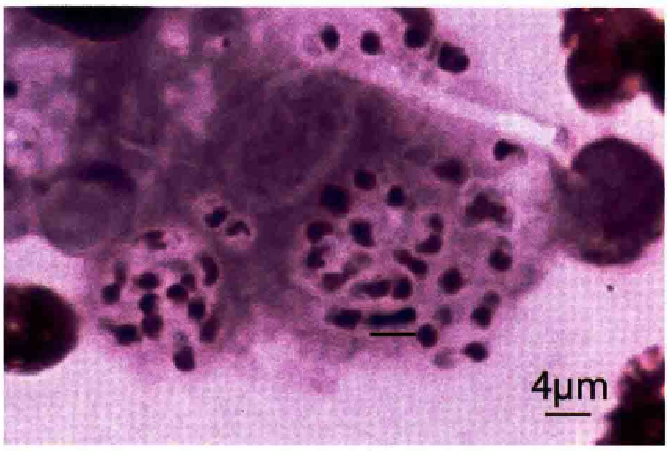


图 119-26

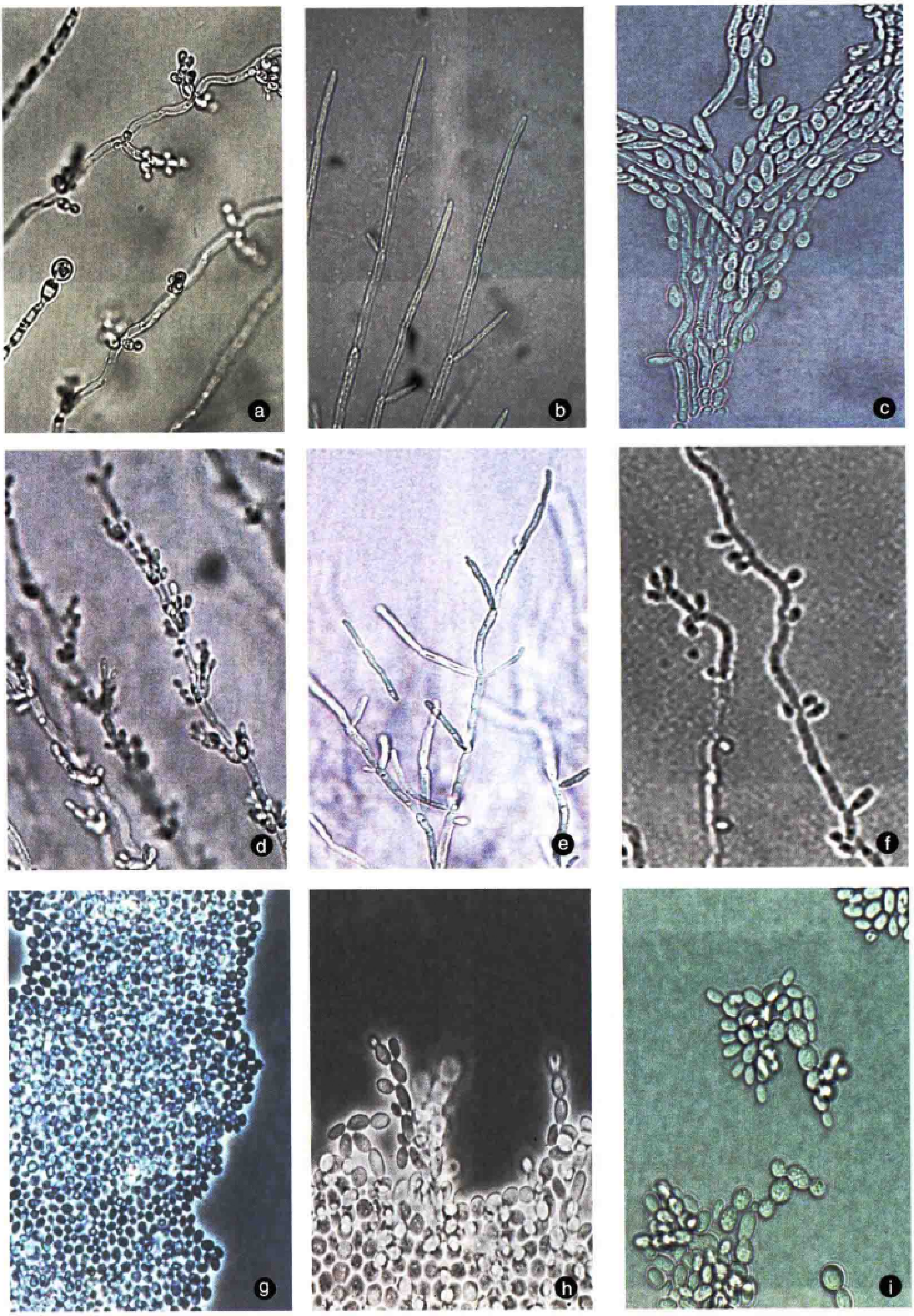


图 120-1

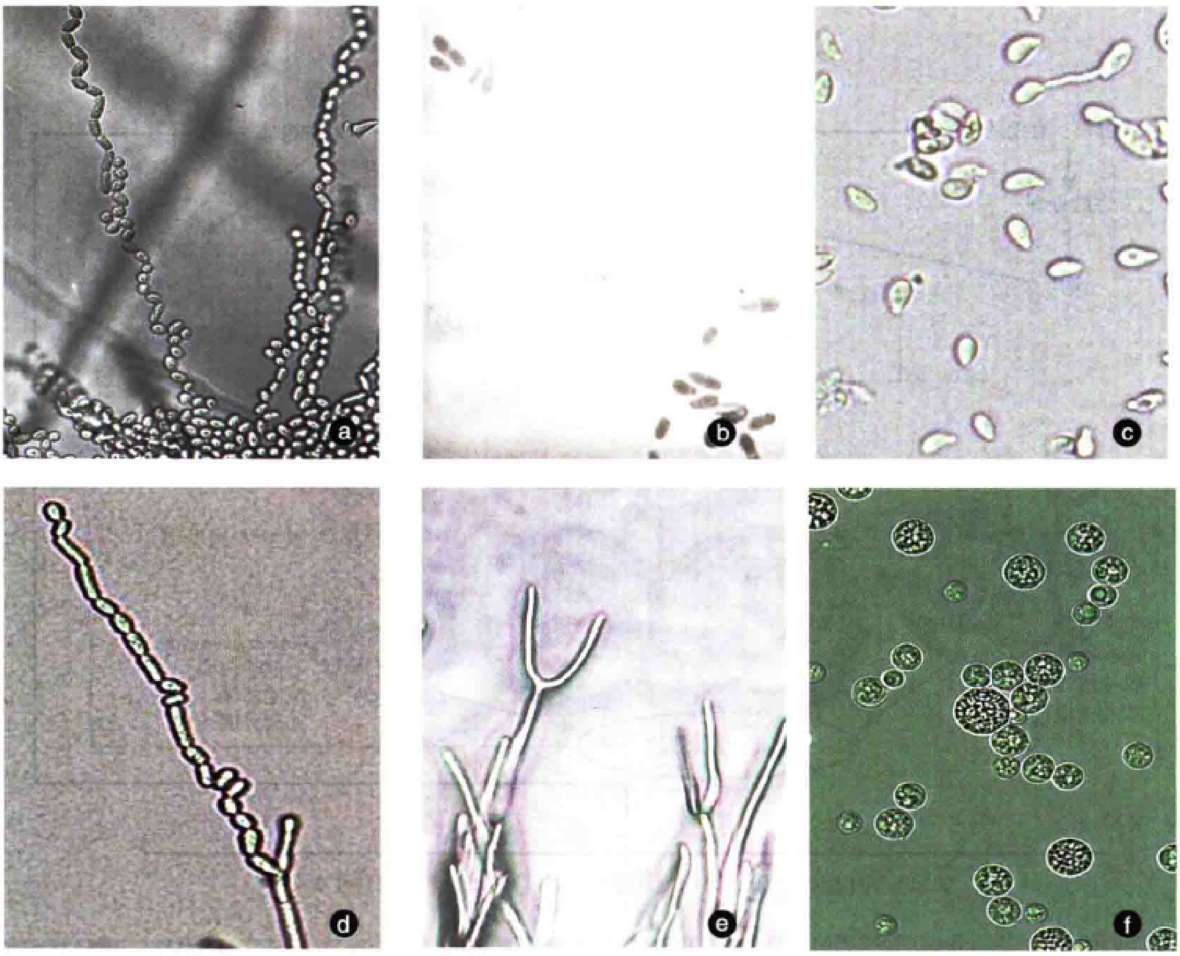


图 120-2

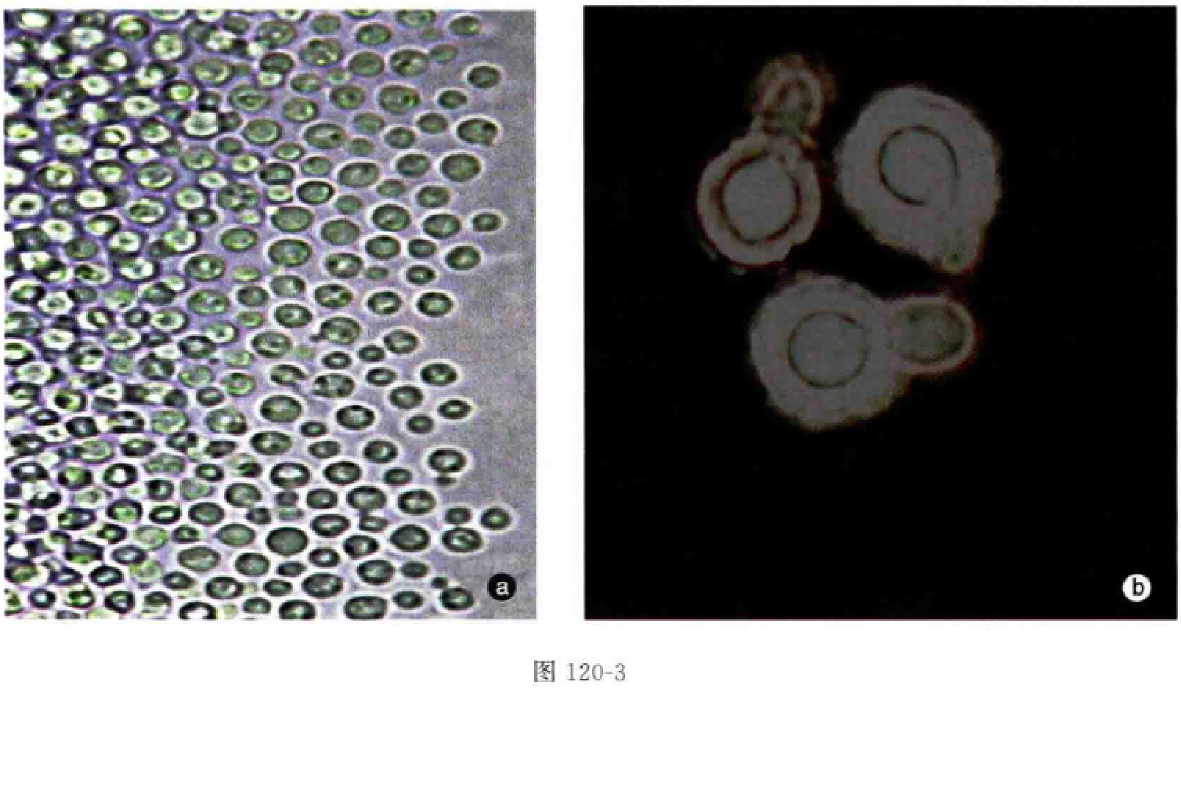


图 120-3

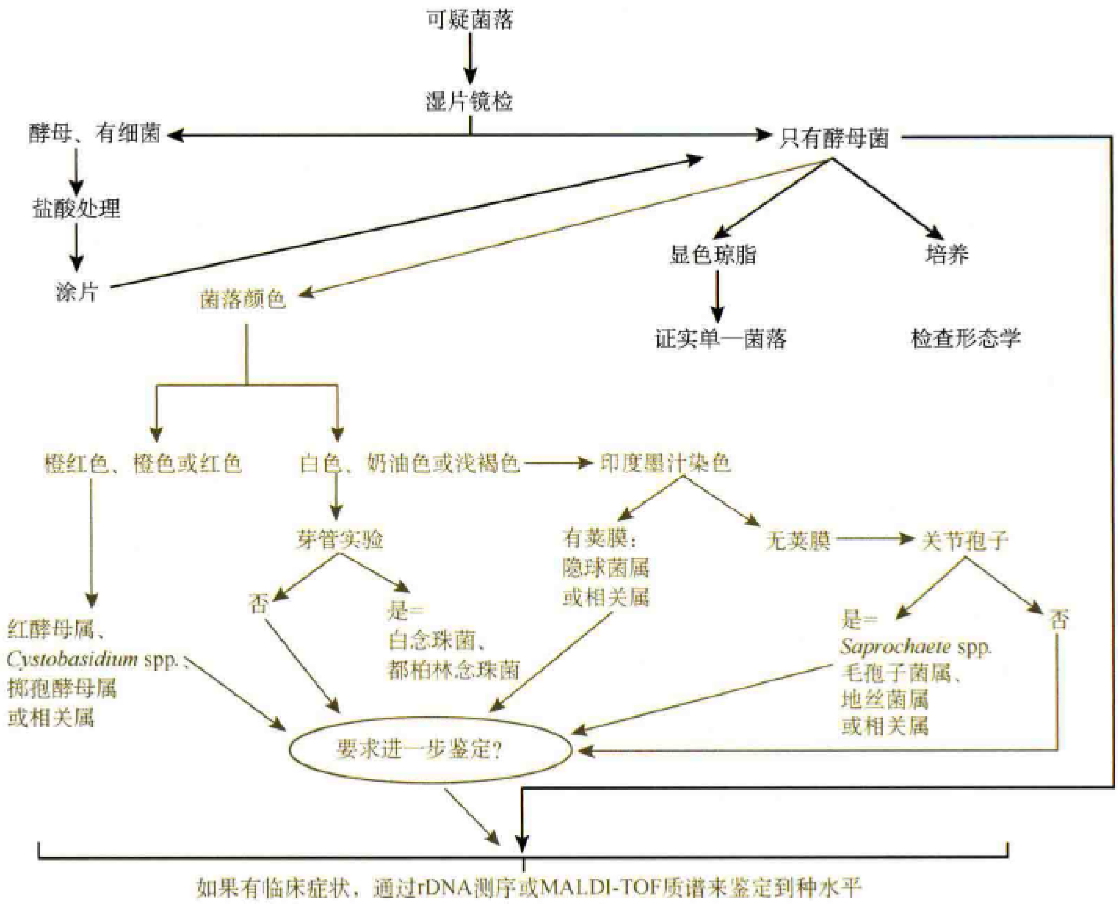


图 120-4

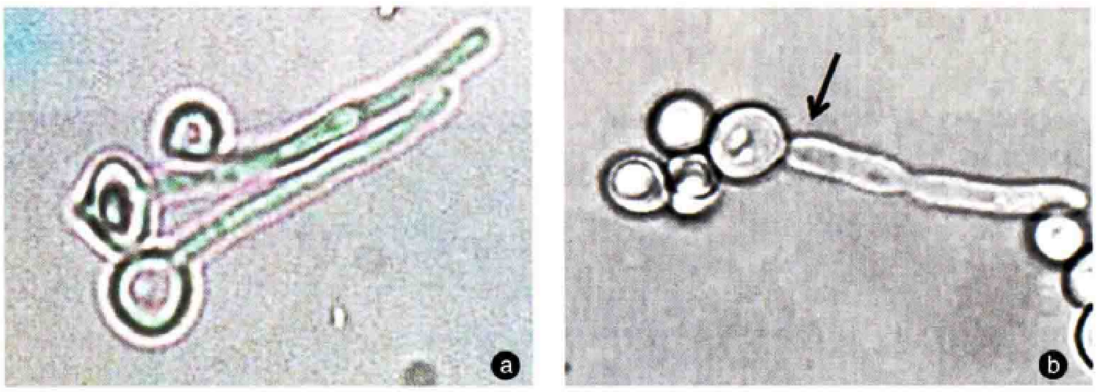


图 120-5

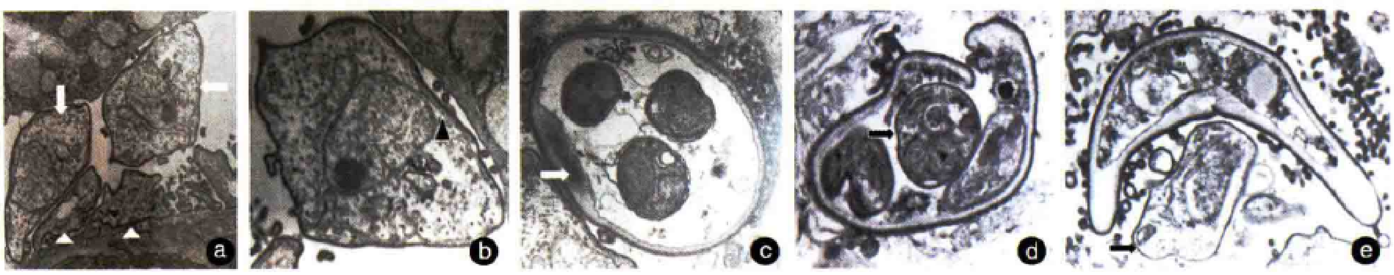


图 121-1

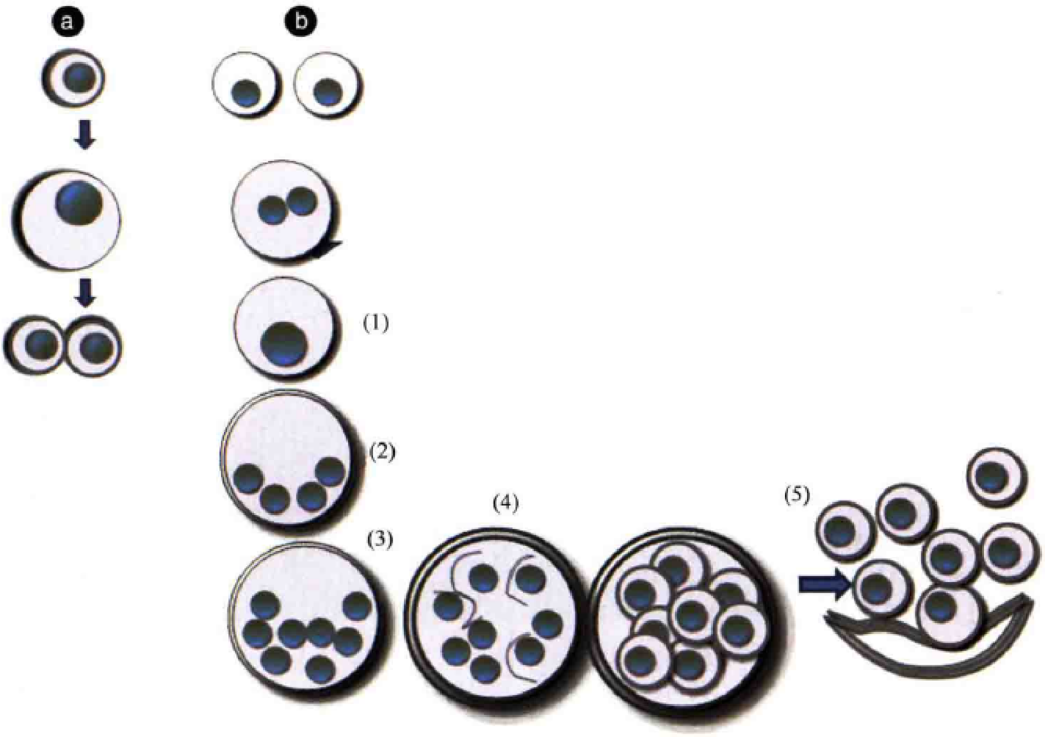


图 121-2

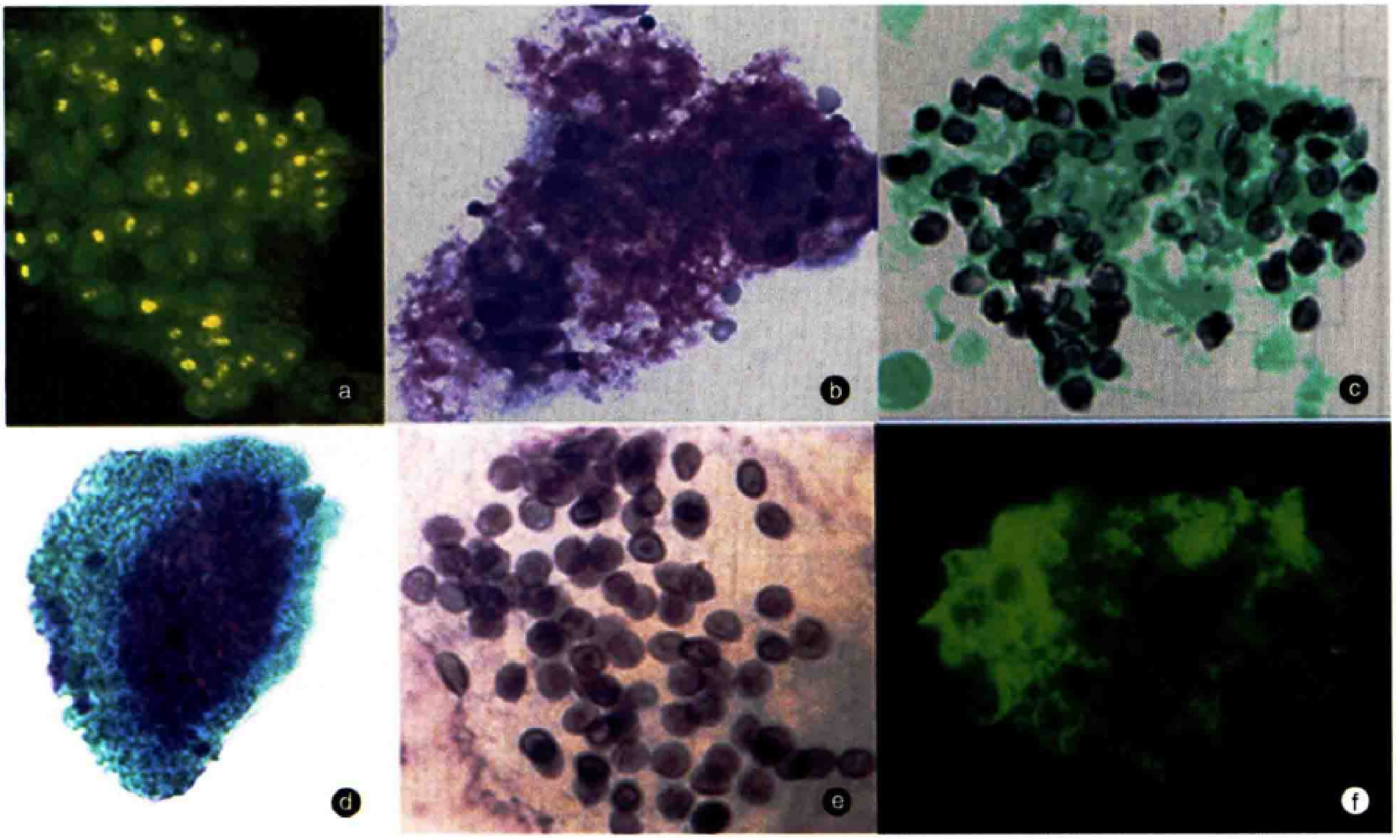


图 121-3

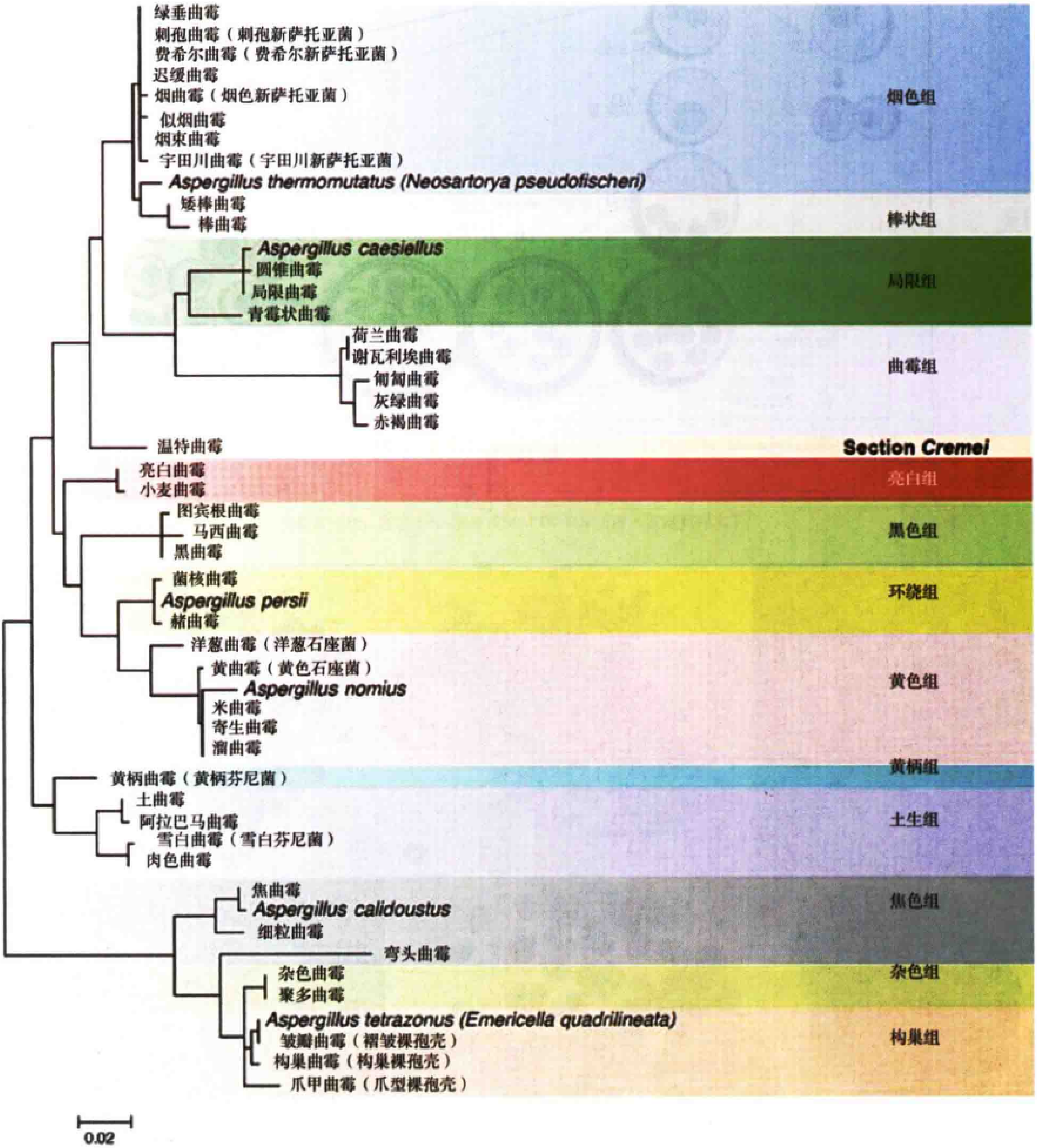

绿垂曲霉
刺孢曲霉（刺孢新萨托亚菌）
费希尔曲霉（费希尔新萨托亚菌）
迟缓曲霉
烟曲霉（烟色新萨托亚菌）
似烟曲霉
烟束曲霉
宇田川曲霉（宇田川新萨托亚菌）
Aspergillus thermomutatus (Neosartorya pseudofischeri)
烟色组
矮棒曲霉
棒曲霉
棒状组
Aspergillus caesiellus
圆锥曲霉
局限曲霉
青霉状曲霉
局限组
荷兰曲霉
谢瓦利埃曲霉
匍匐曲霉
灰绿曲霉
赤褐曲霉
曲霉组
温特曲霉
Section Cremei
亮白曲霉
小麦曲霉
亮白组
图宾根曲霉
马西曲霉
黑曲霉
黑色组
菌核曲霉
Aspergillus persii
赭曲霉
环绕组
洋葱曲霉（洋葱石座菌）
黄曲霉（黄色石座菌）
Aspergillus nomius
米曲霉
寄生曲霉
溜曲霉
黄色组
黄柄曲霉（黄柄芬尼菌）
黄柄组
土曲霉
阿拉巴马曲霉
雪白曲霉（雪白芬尼菌）
肉色曲霉
土生组
焦曲霉
Aspergillus calidoustus
细粒曲霉
焦色组
弯头曲霉
杂色曲霉
聚多曲霉
杂色组
Aspergillus tetrazonus (Emericella quadrilineata)
皱褶曲霉（褶皱裸孢壳）
构巢曲霉（构巢裸孢壳）
爪甲曲霉（爪型裸孢壳）
构巢组
0.02

图 122-1

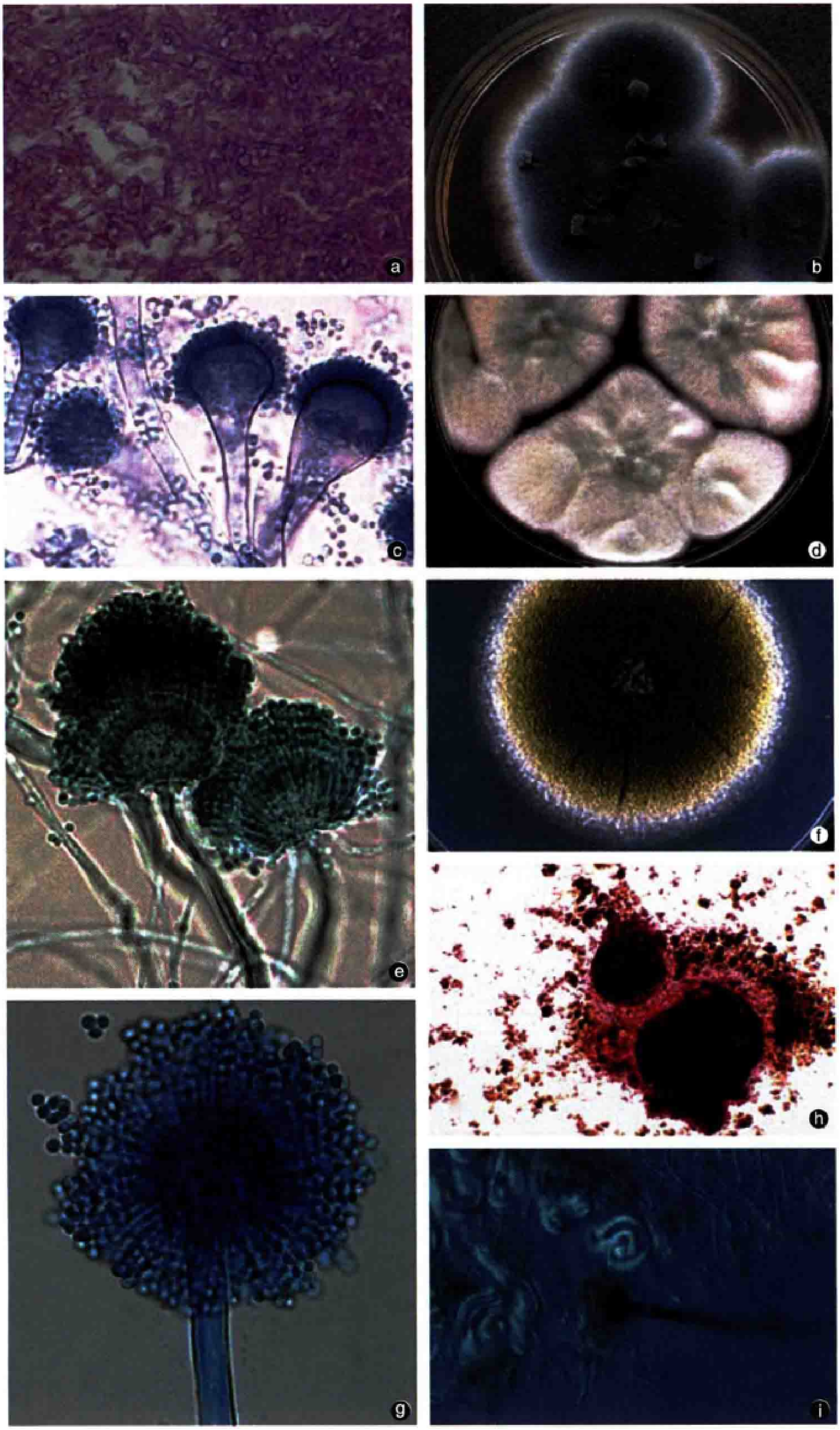


图 122-3

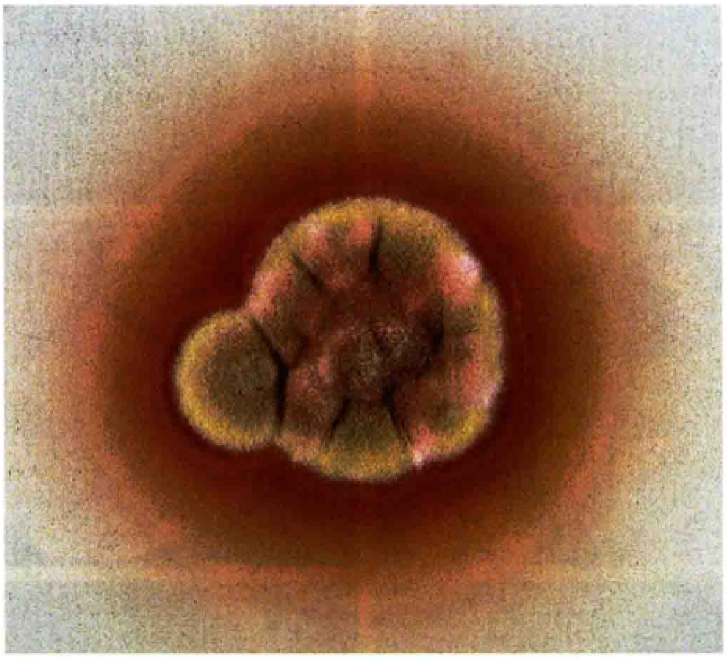


图 122-4

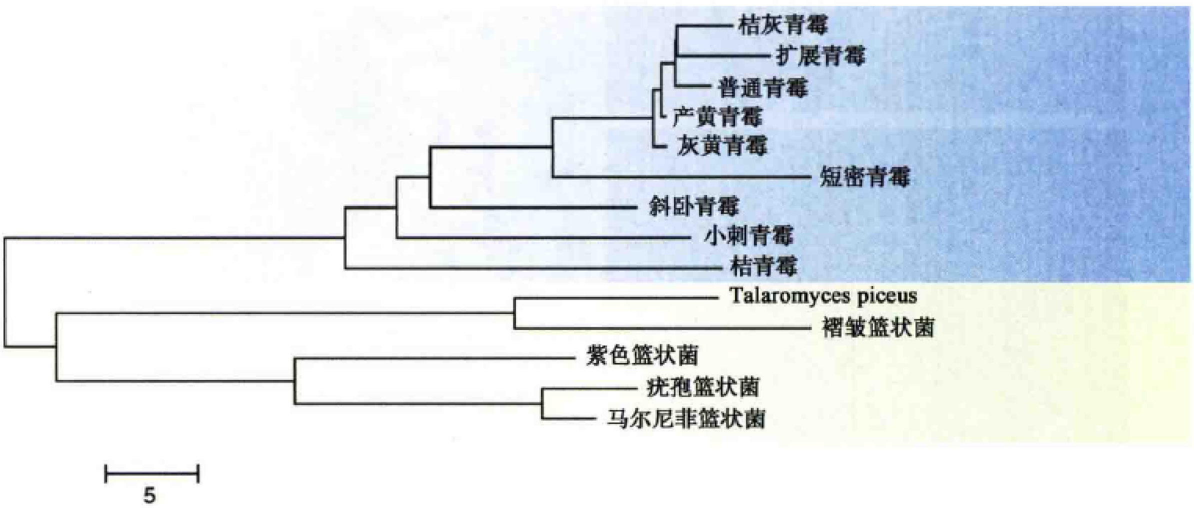

桔灰青霉
扩展青霉
普通青霉
产黄青霉
灰黄青霉
短密青霉
斜卧青霉
小刺青霉
桔青霉
Talaromyces piceus
褶皱篮状菌
紫色篮状菌
扰孢篮状菌
马尔尼菲篮状菌
5

图 122-5

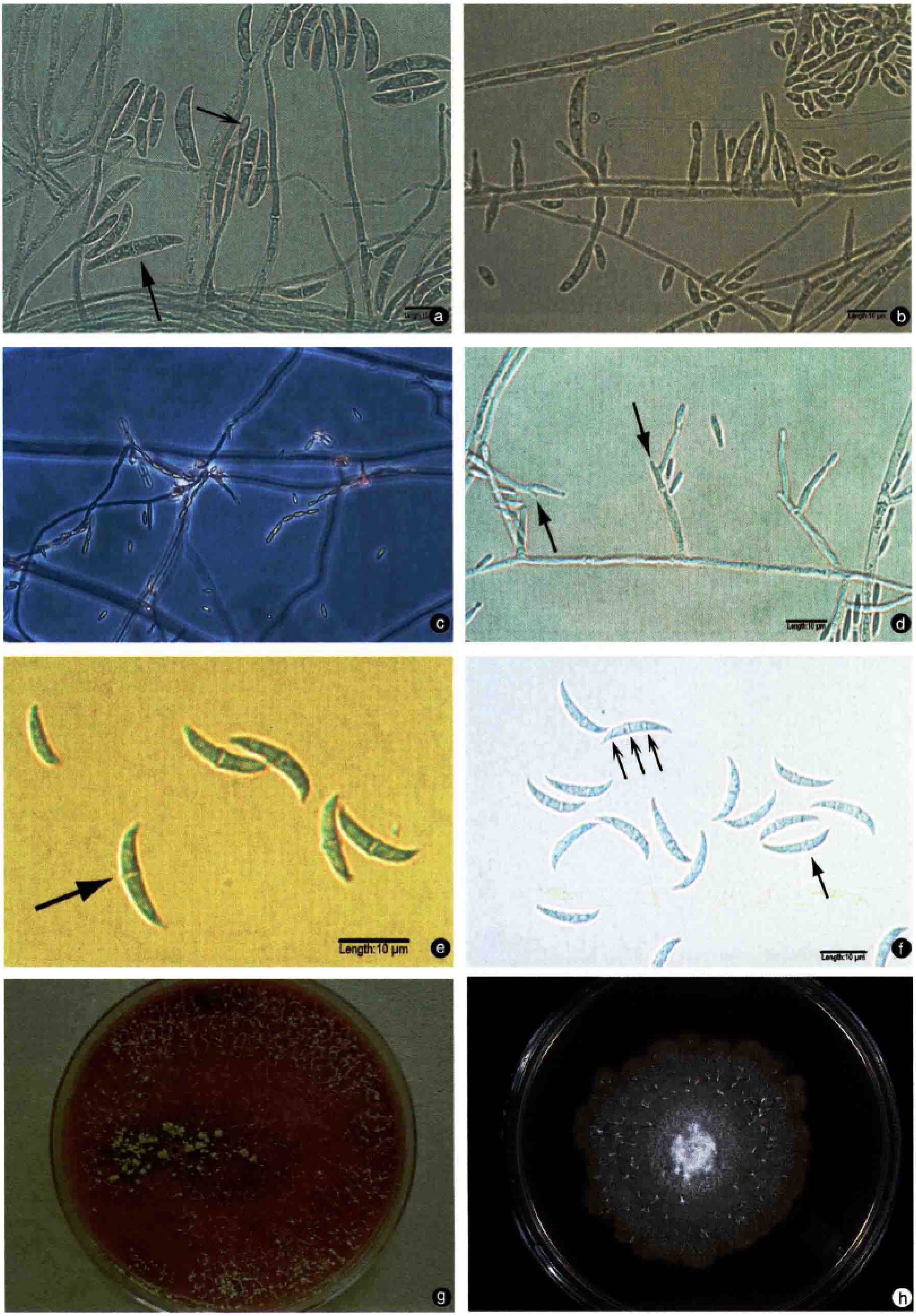


图 123-1

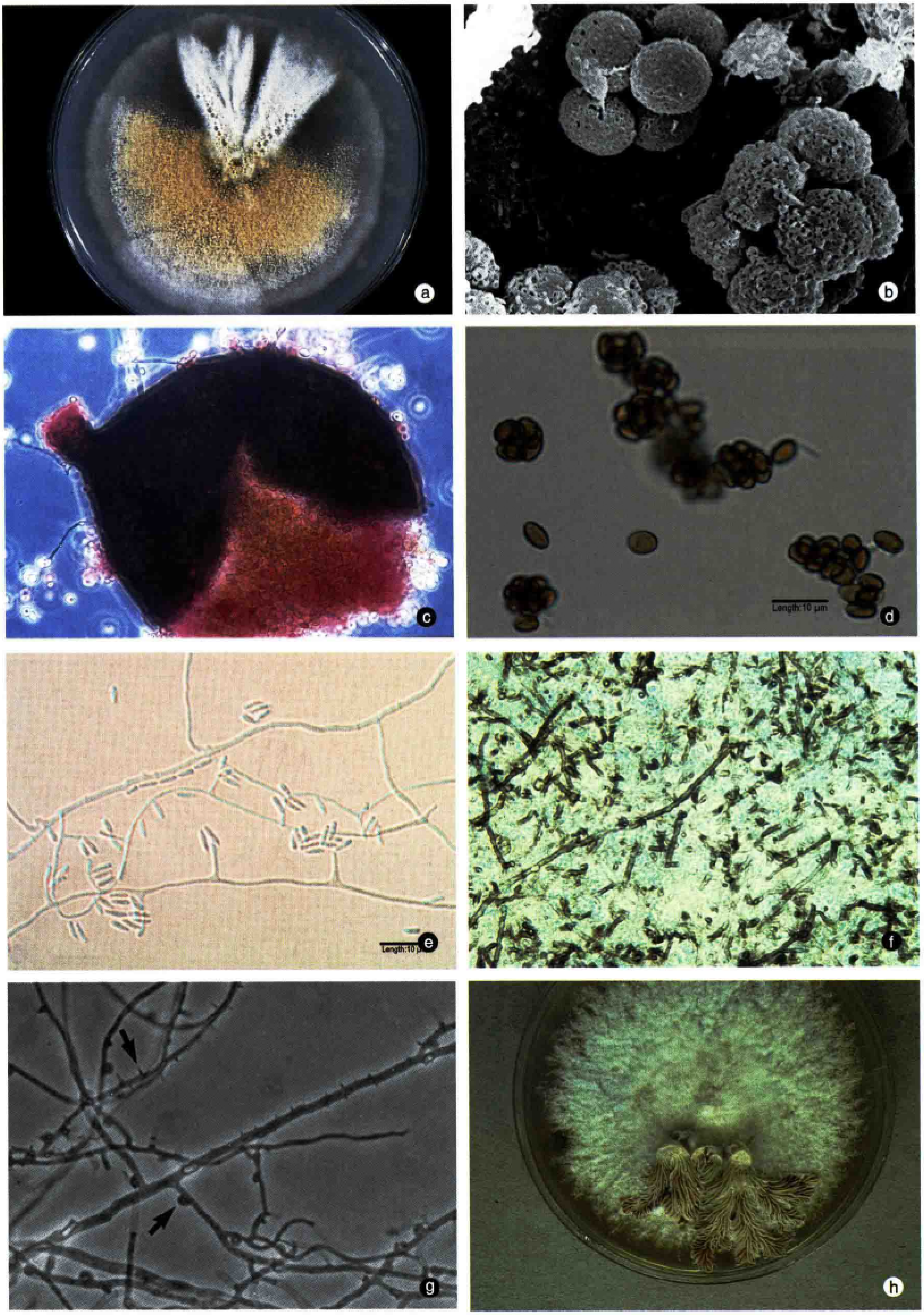


图 123-2

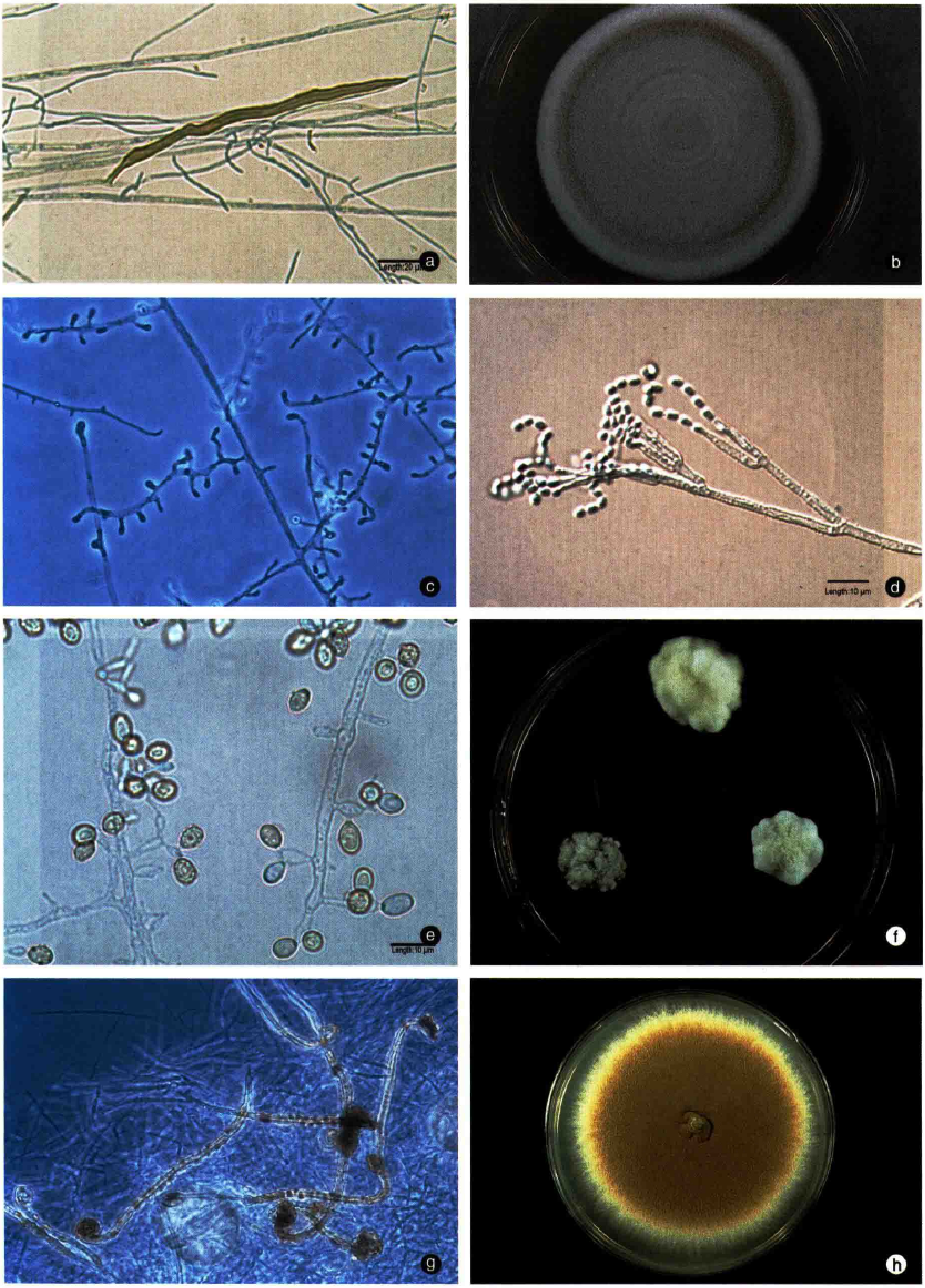


图 123-3

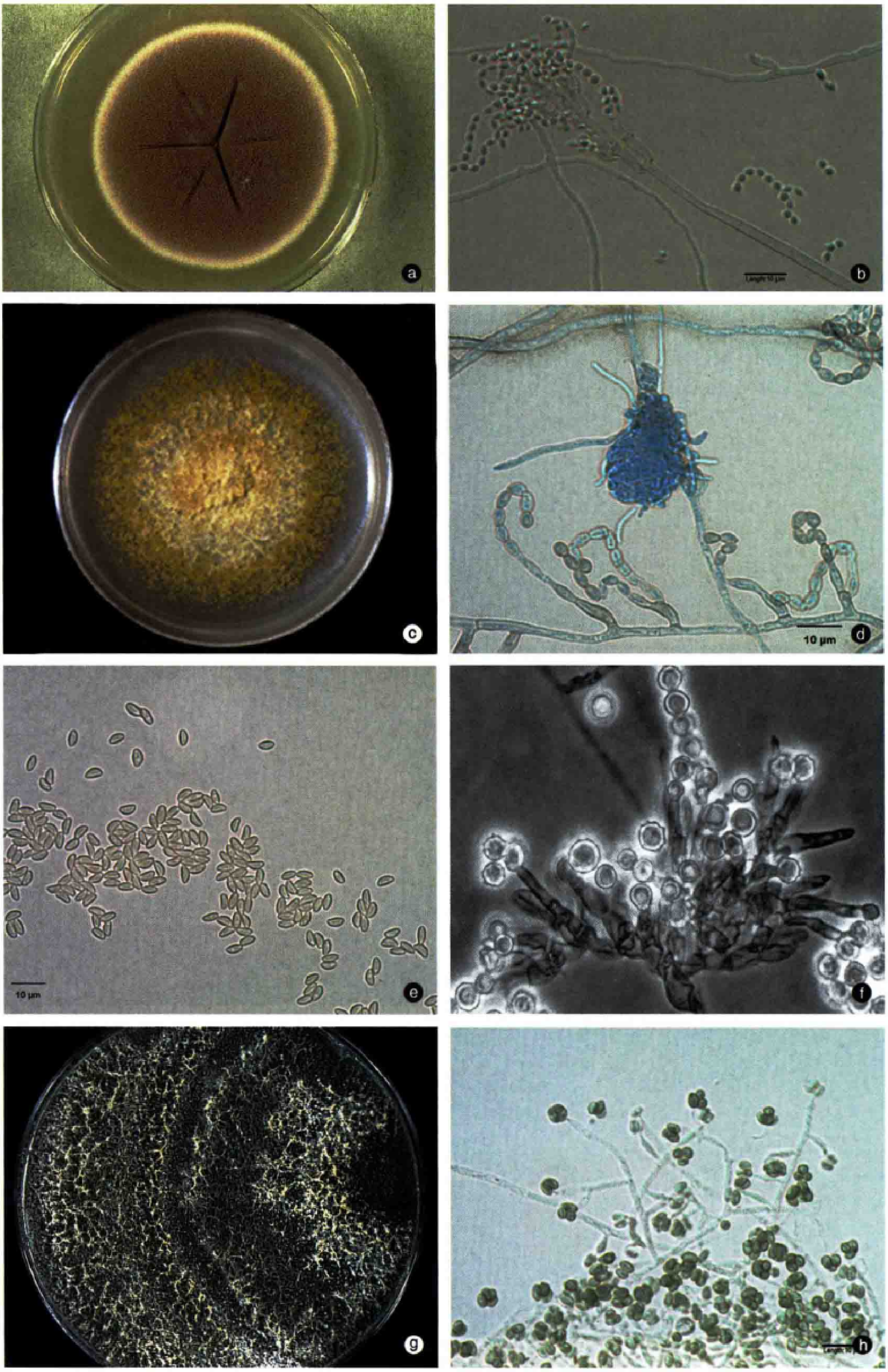


图 123-4

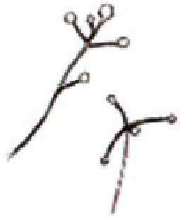
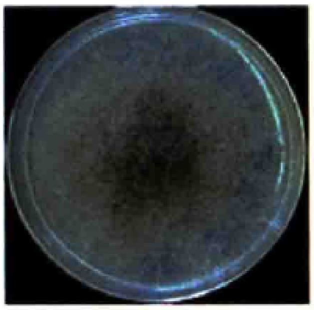
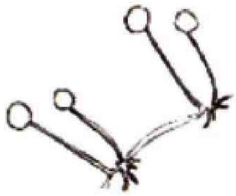
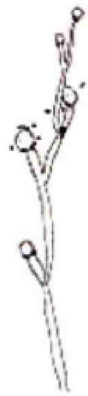
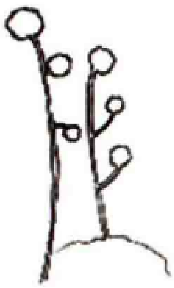
种	菌落形态（MEA）	孢子梗形态	
横梗霉 犁头霉		轮状分支；出现在匍匐茎和假根之间	
根霉		大部分不分支；与假根相对	
毛霉		大部分有分支	
根毛霉		大规则分支；出现在假根之间	

图 124-2

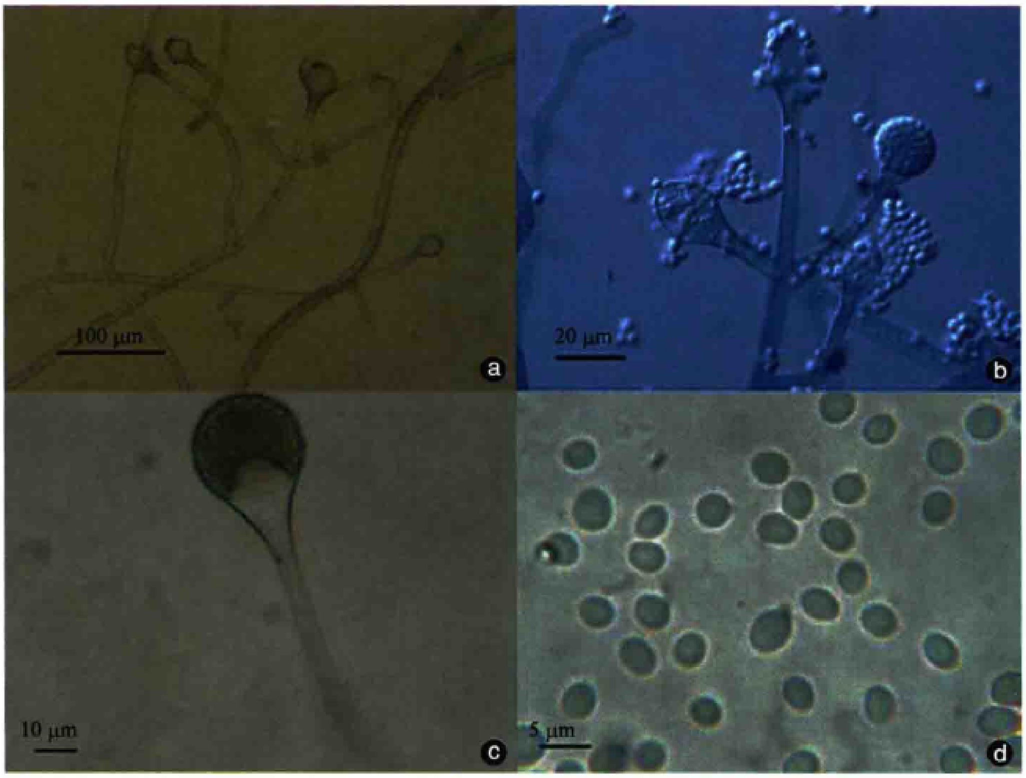


图 124-4

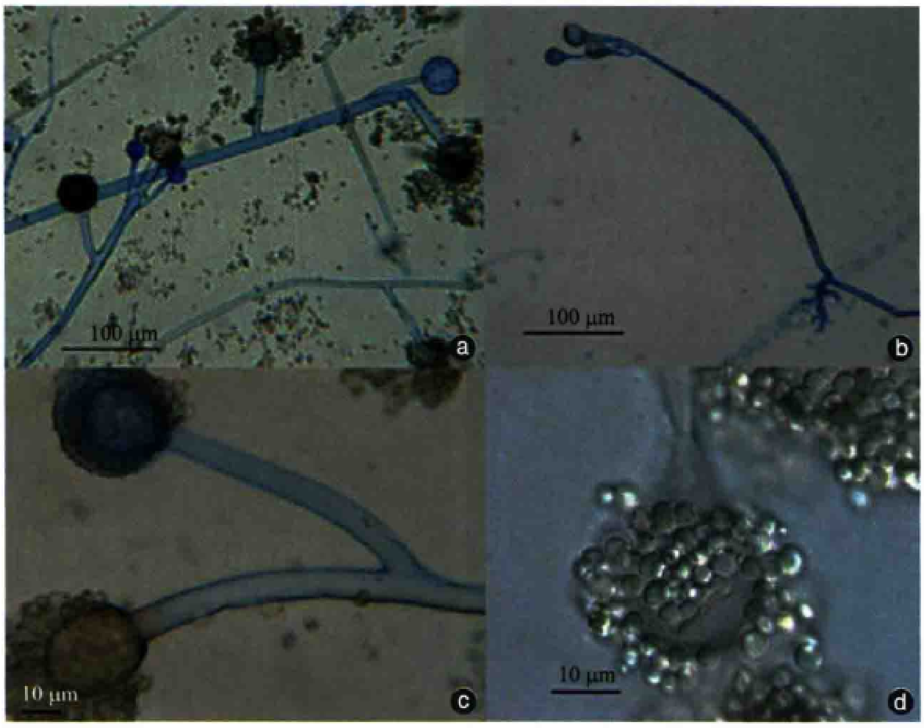


图 124-5

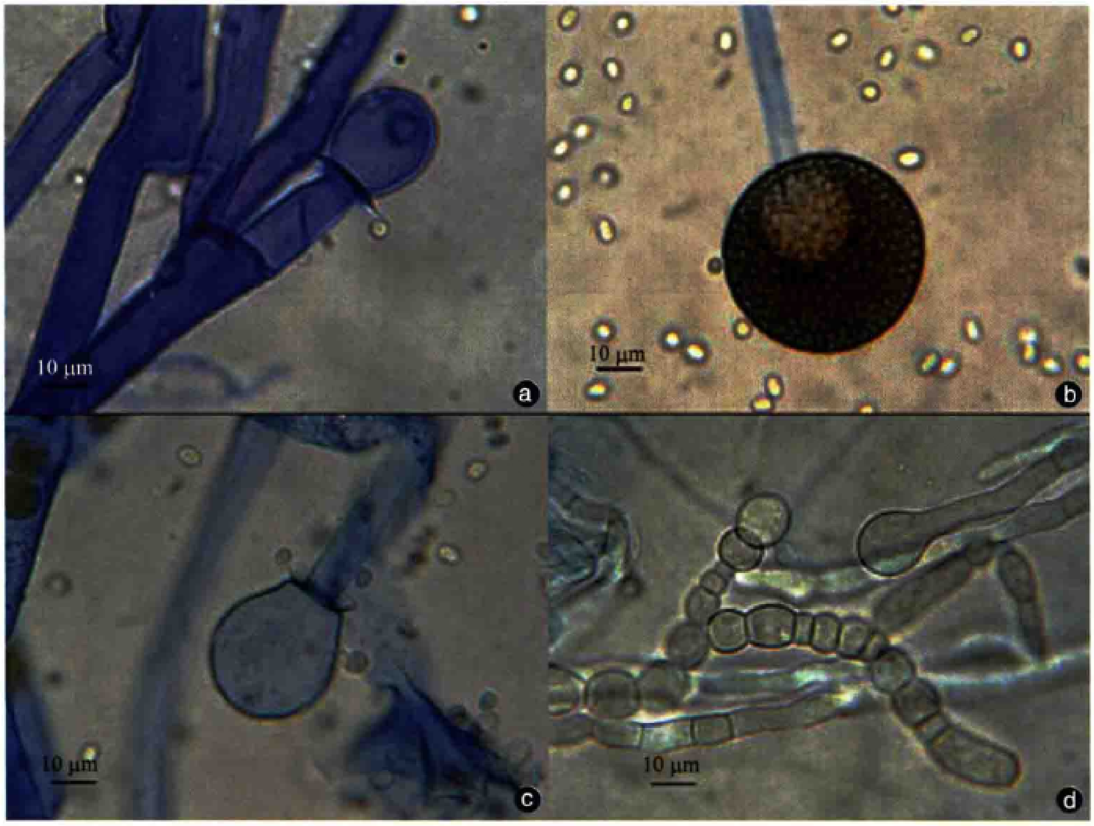


图 124-6

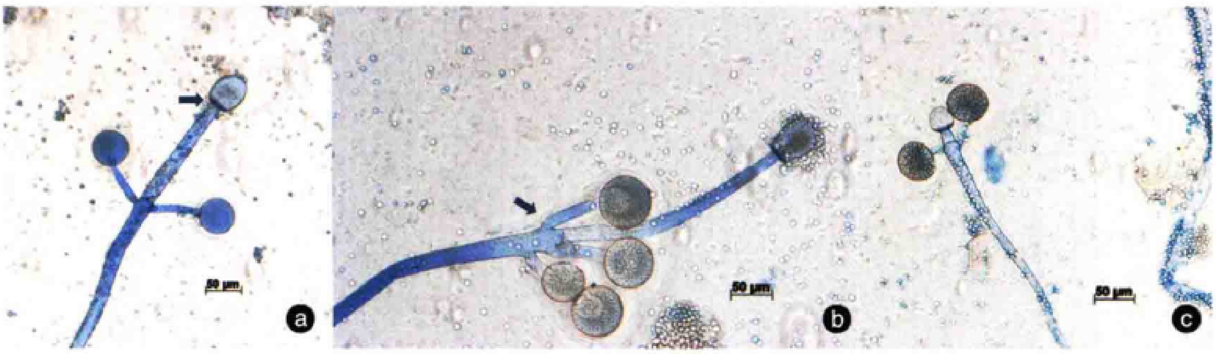


图 124-7


100 μm
a
100 μm
b
10 μm
c
10 μm
d
10 μm
e
5 μm
f

图 124-8


100 μm
a
10 μm
b
10 μm
c
5 μm
d

图 124-9

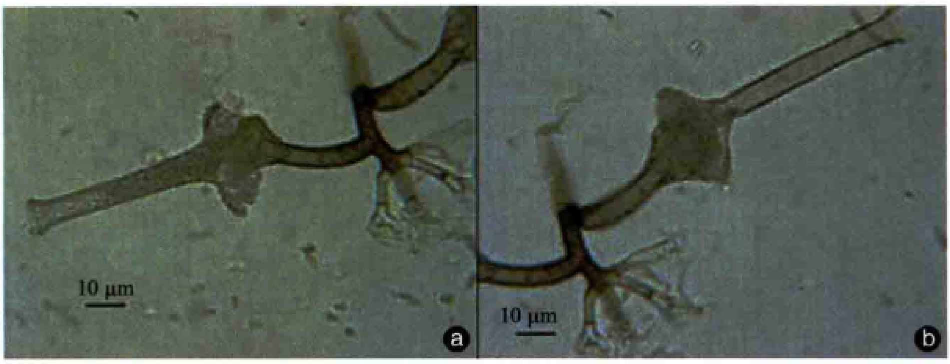


图 124-10

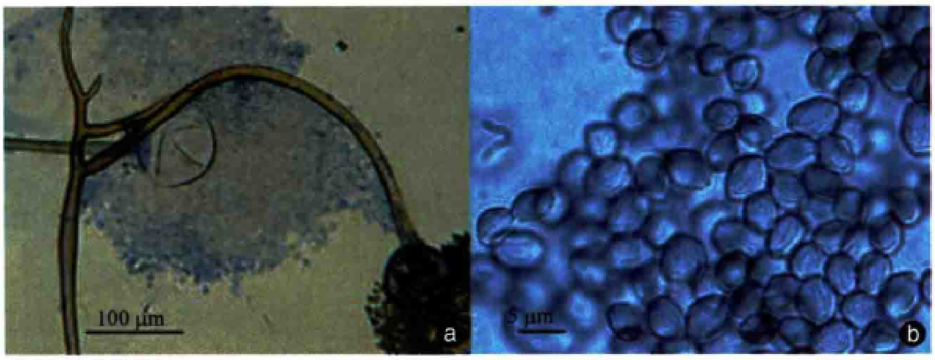


图 124-11



图 124-12

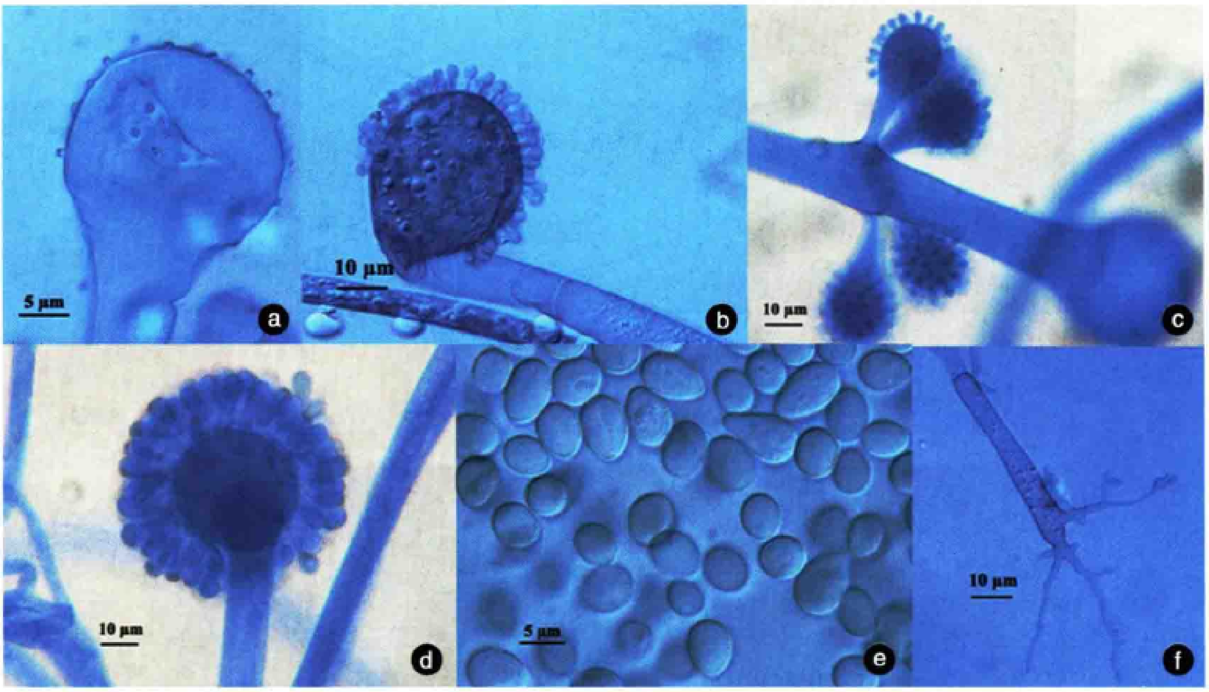


图 124-13

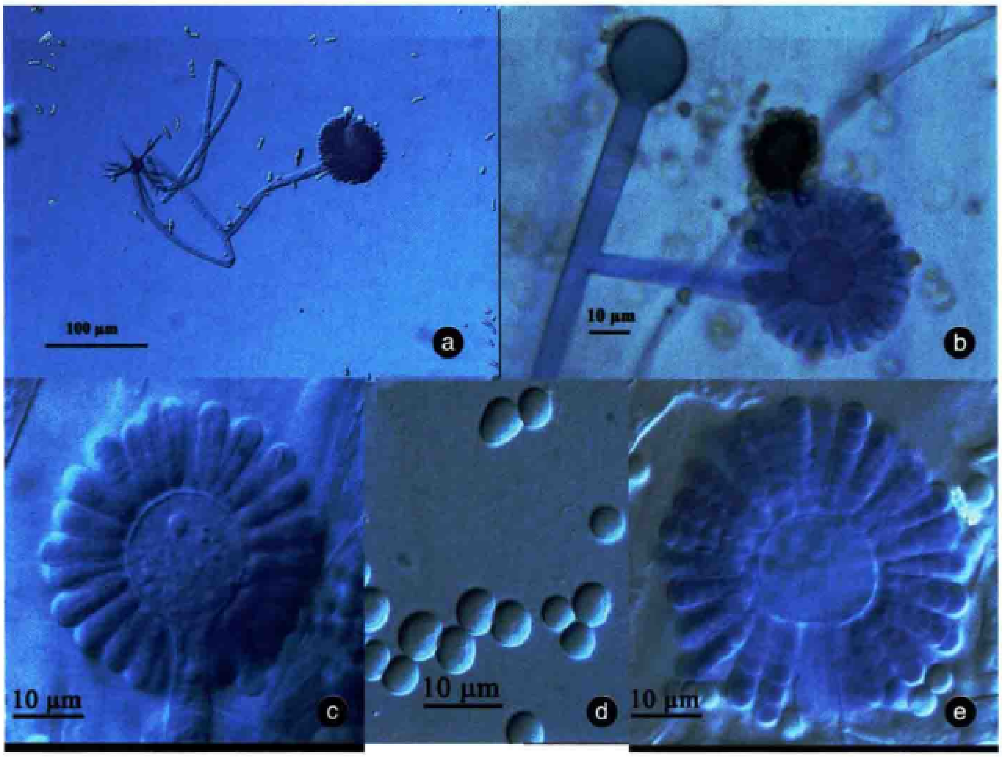


图 124-14

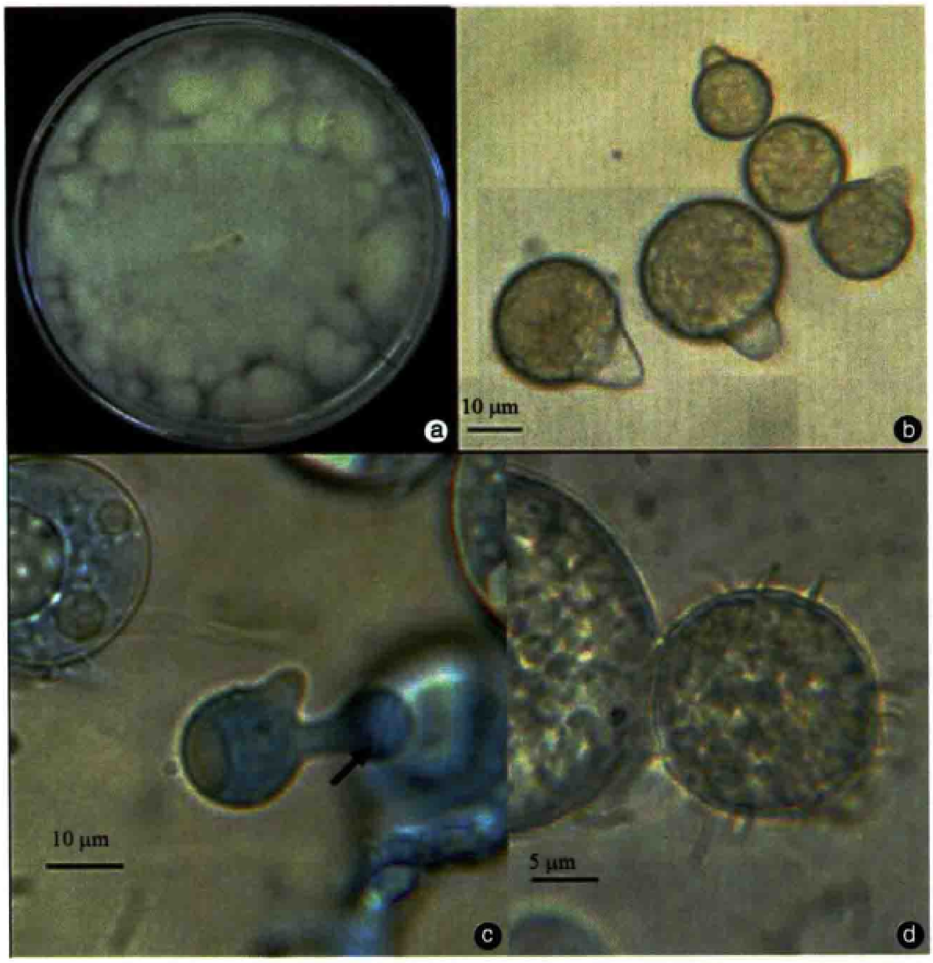


图 124-15

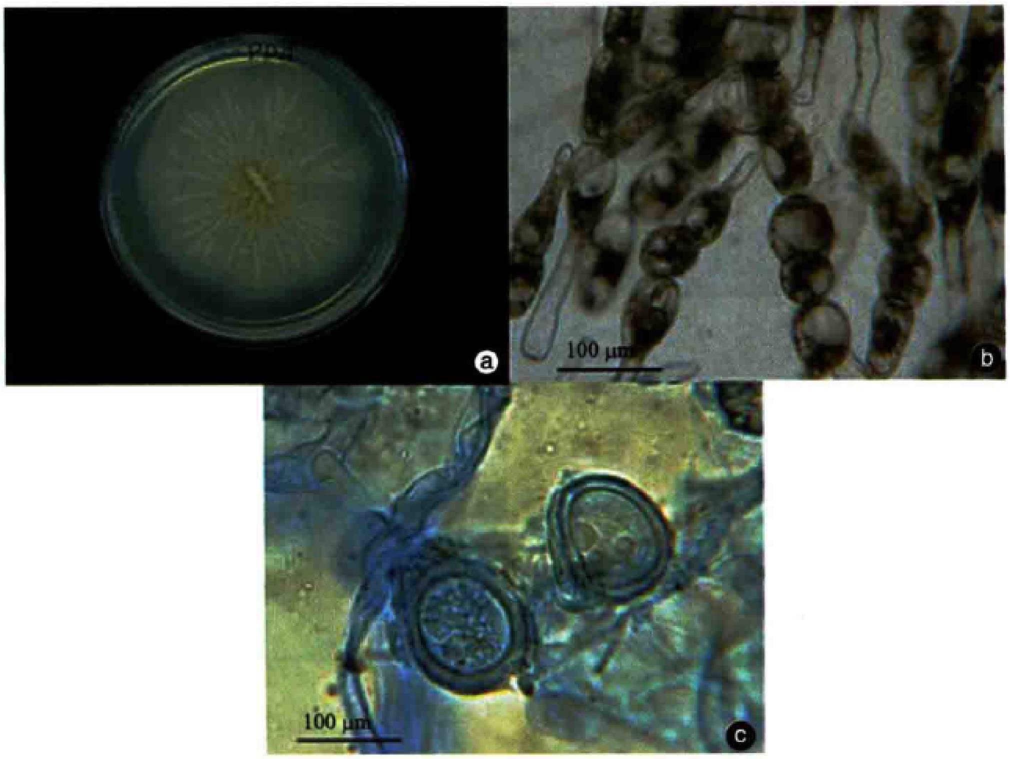


图 124-16

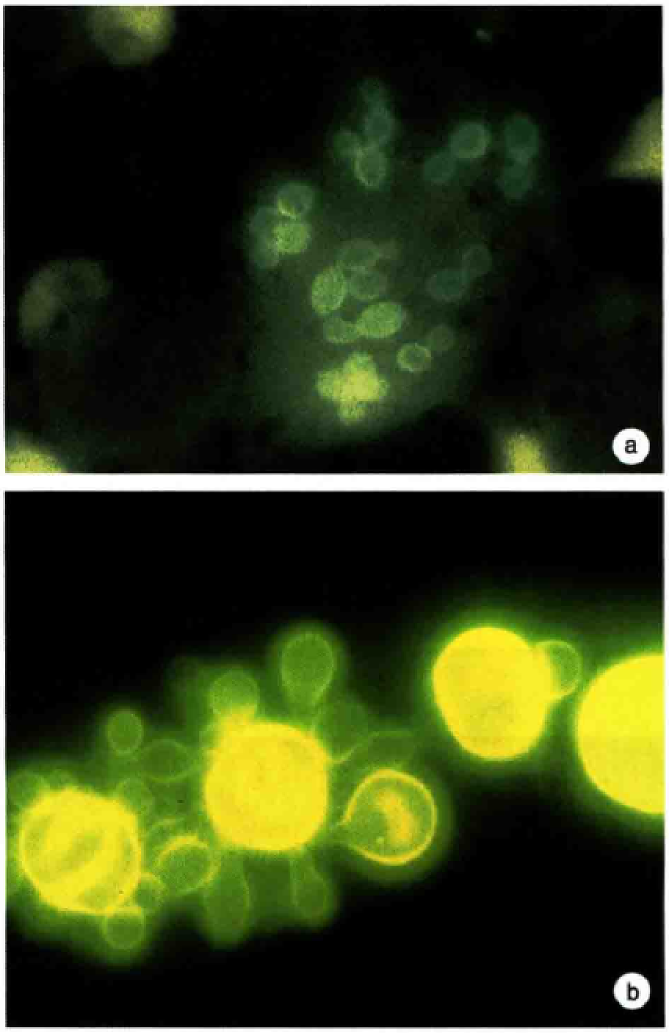


图 125-3

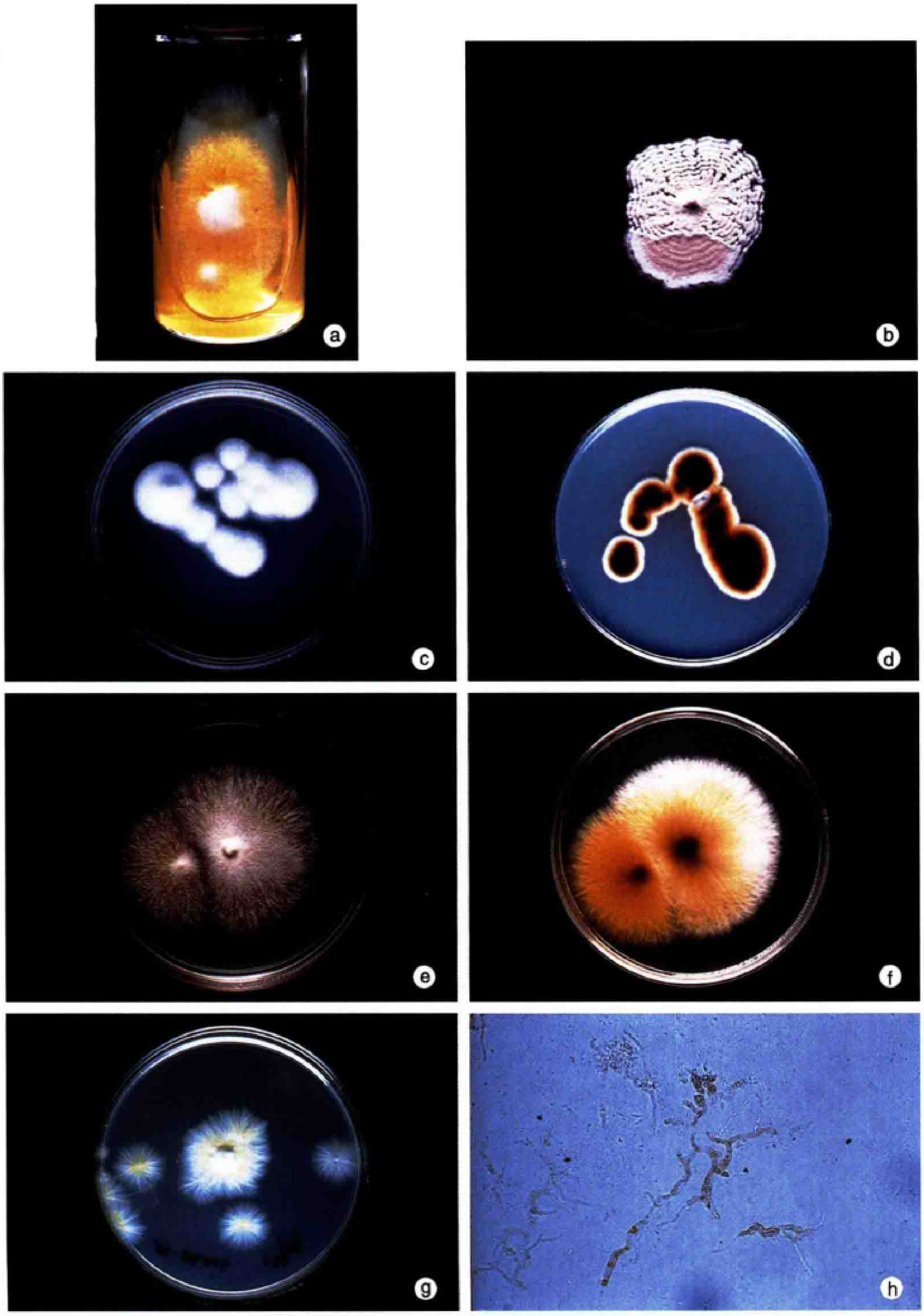


图 126-18

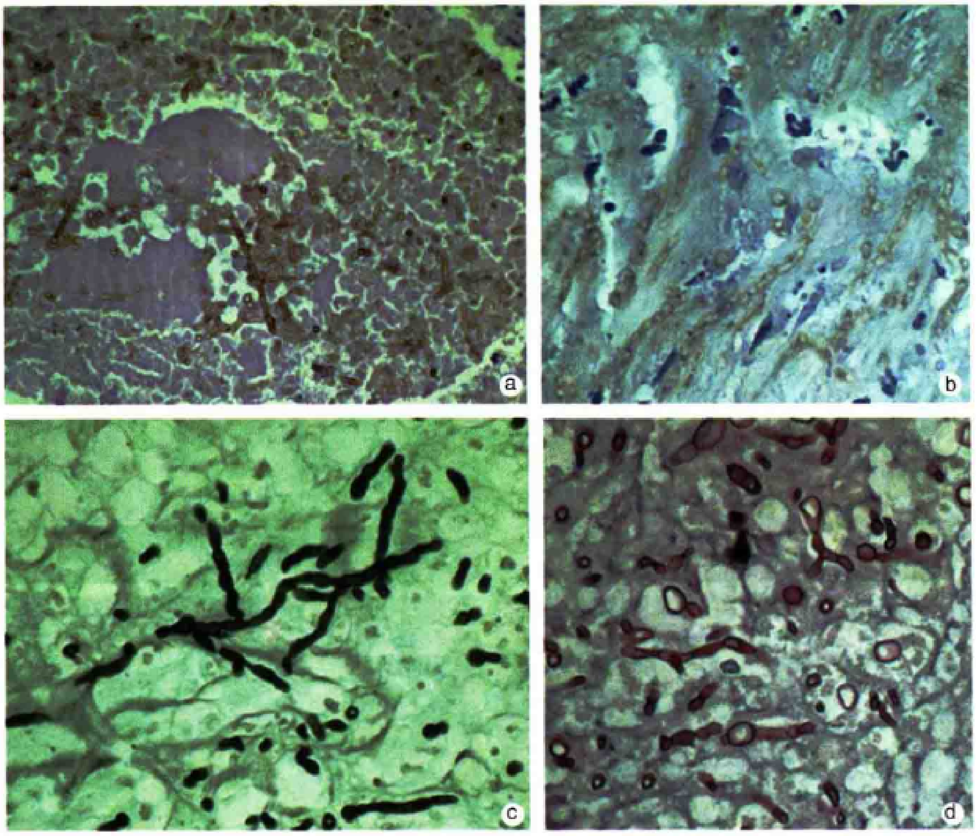


图 127-5

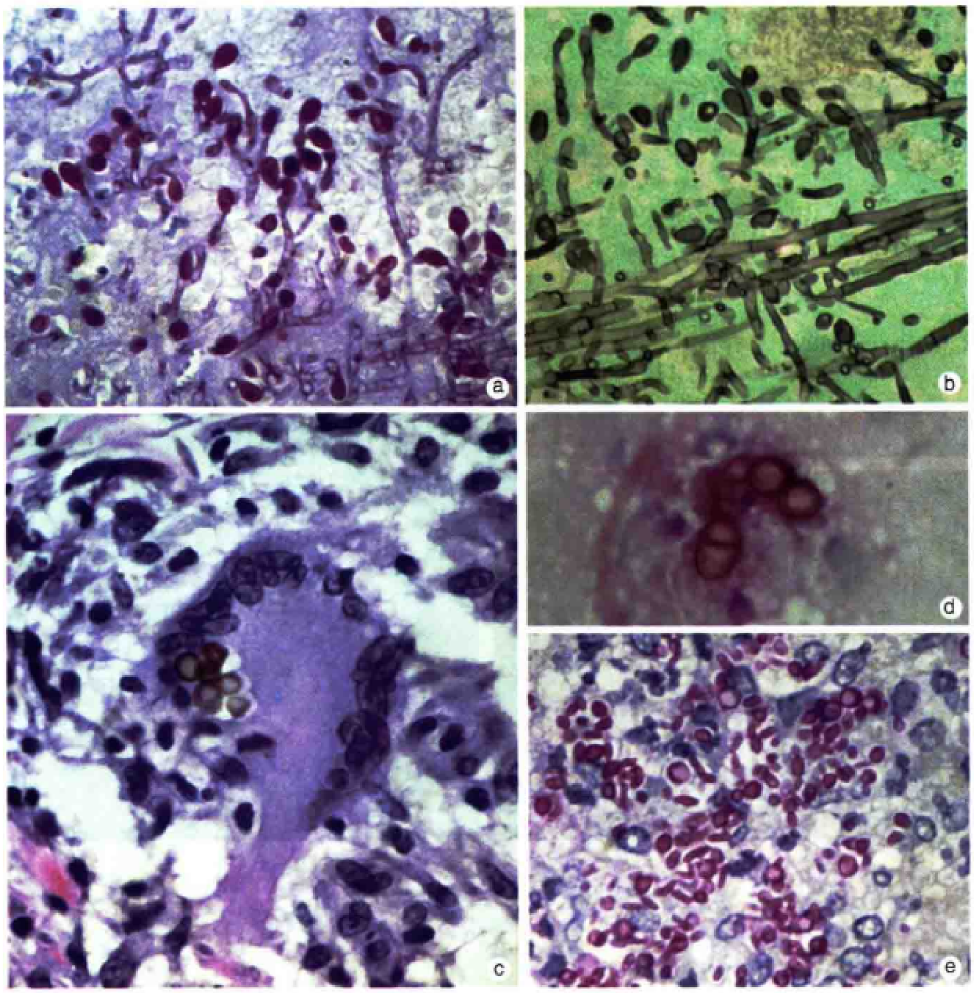


图 127-6

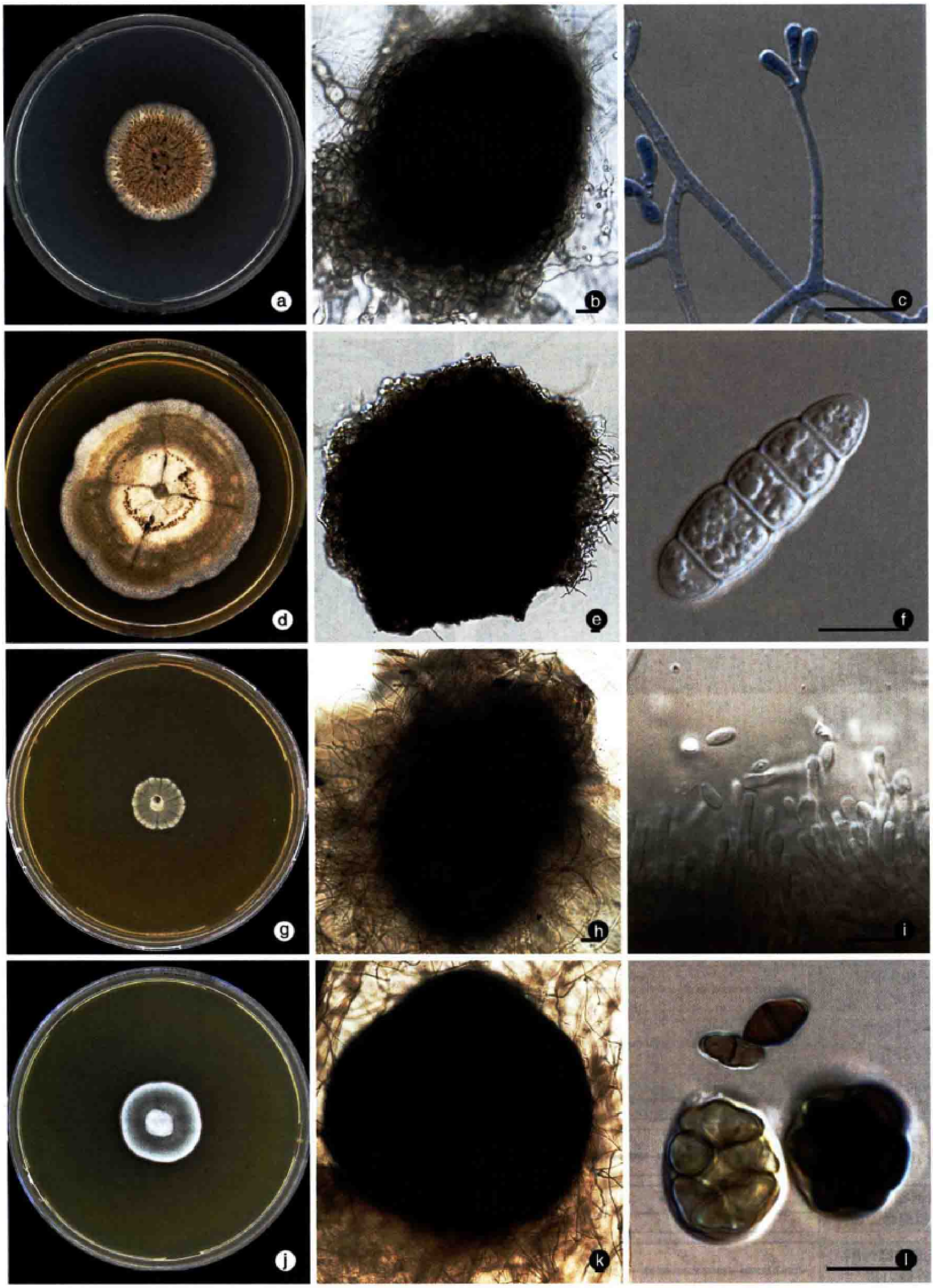


图 128-1

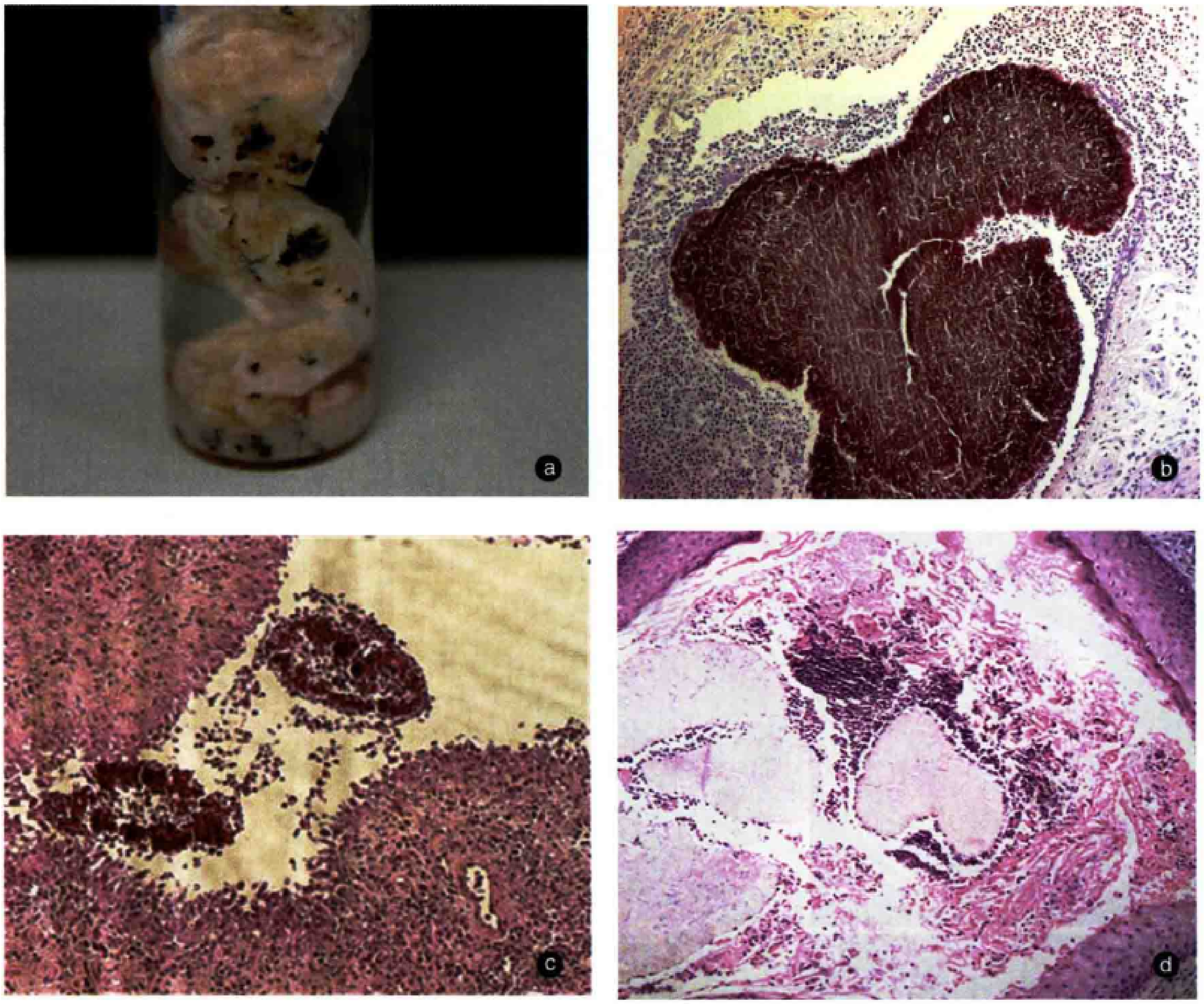


图 128-2

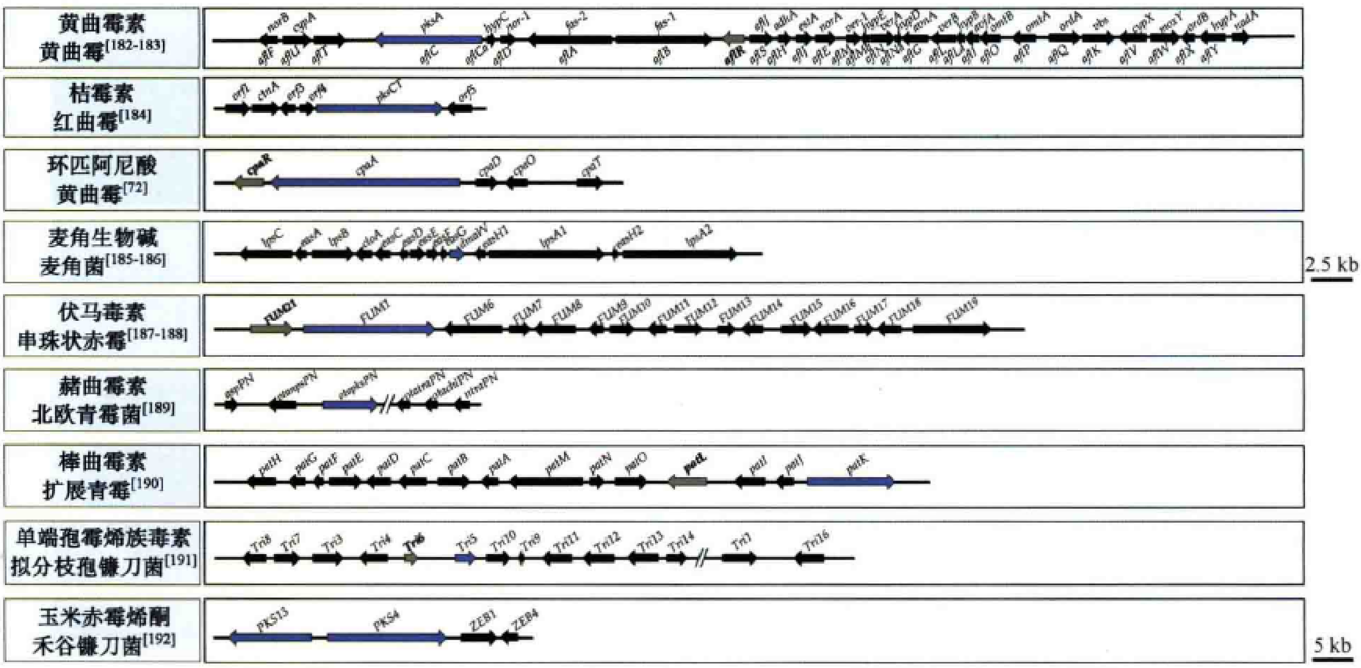

黄曲霉素
黄曲霉[182-183]
pksA
桔霉素
红曲霉[184]
pksCT
环匹阿尼酸
黄曲霉[72]
cpaA
麦角生物碱
麦角菌[185-186]
伏马毒素
串珠状赤霉[187-188]
FUM1
赭曲霉素
北欧青霉菌[189]
棒曲霉素
扩展青霉[190]
patK
单端孢霉烯族毒素
拟分枝孢镰刀菌[191]
玉米赤霉烯酮
禾谷镰刀菌[192]
PKS13
PKS4
ZEB1
ZEB4
2.5 kb
5 kb

图 129-2

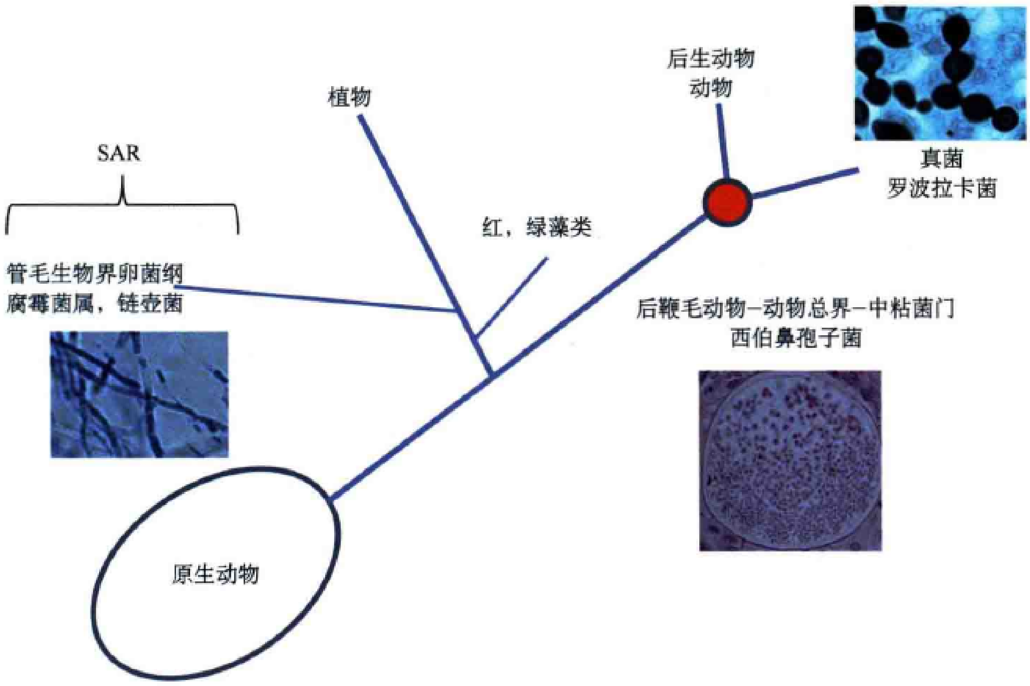

SAR
管毛生物界卵菌纲
腐霉菌属，链壶菌
植物
红，绿藻类
后生动物
动物
真菌
罗波拉卡菌
后鞭毛动物-动物总界-中粘菌门
西伯鼻孢子菌
原生动物

图 130-1

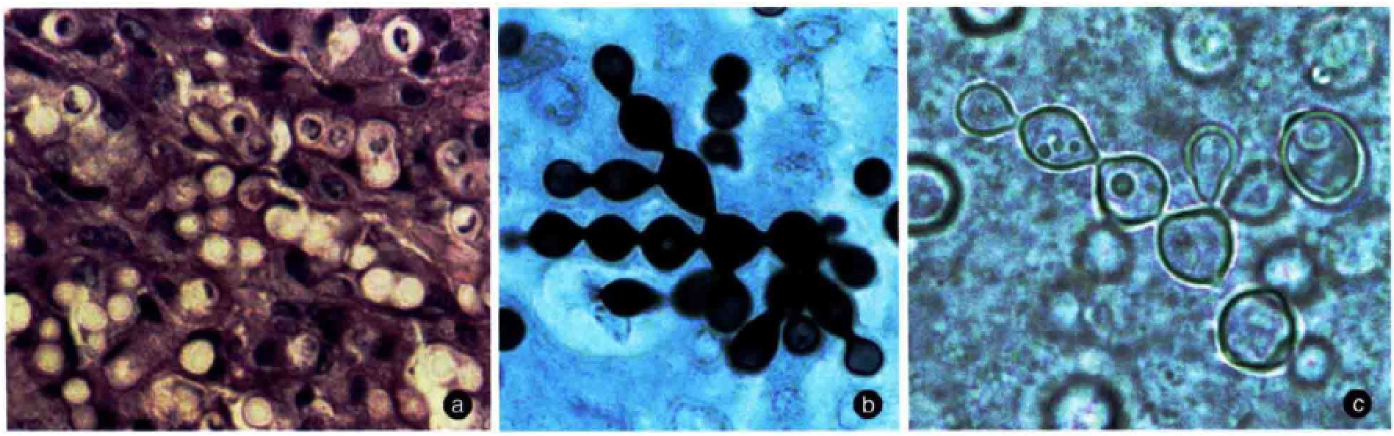


图 130-2

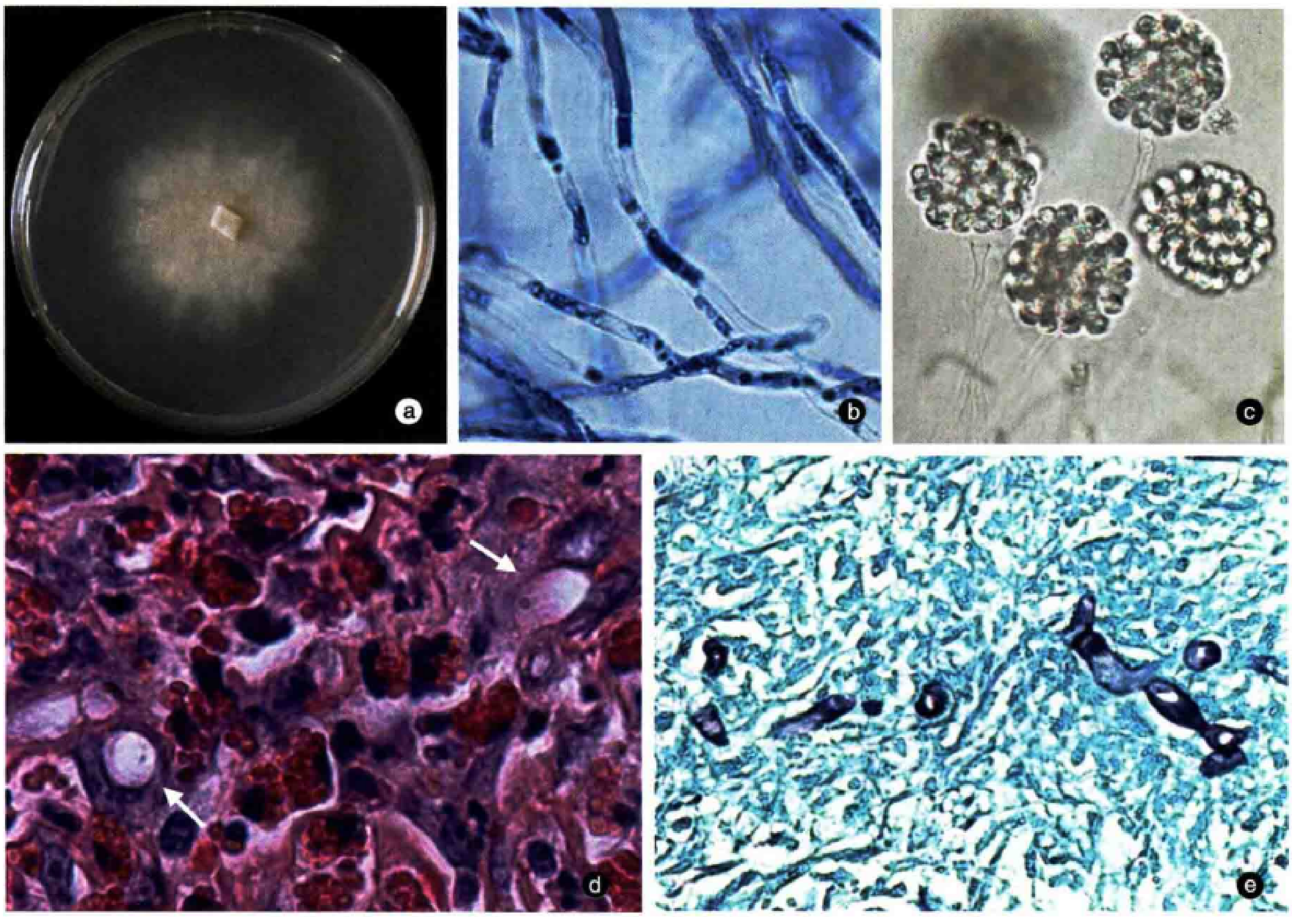


图 130-3

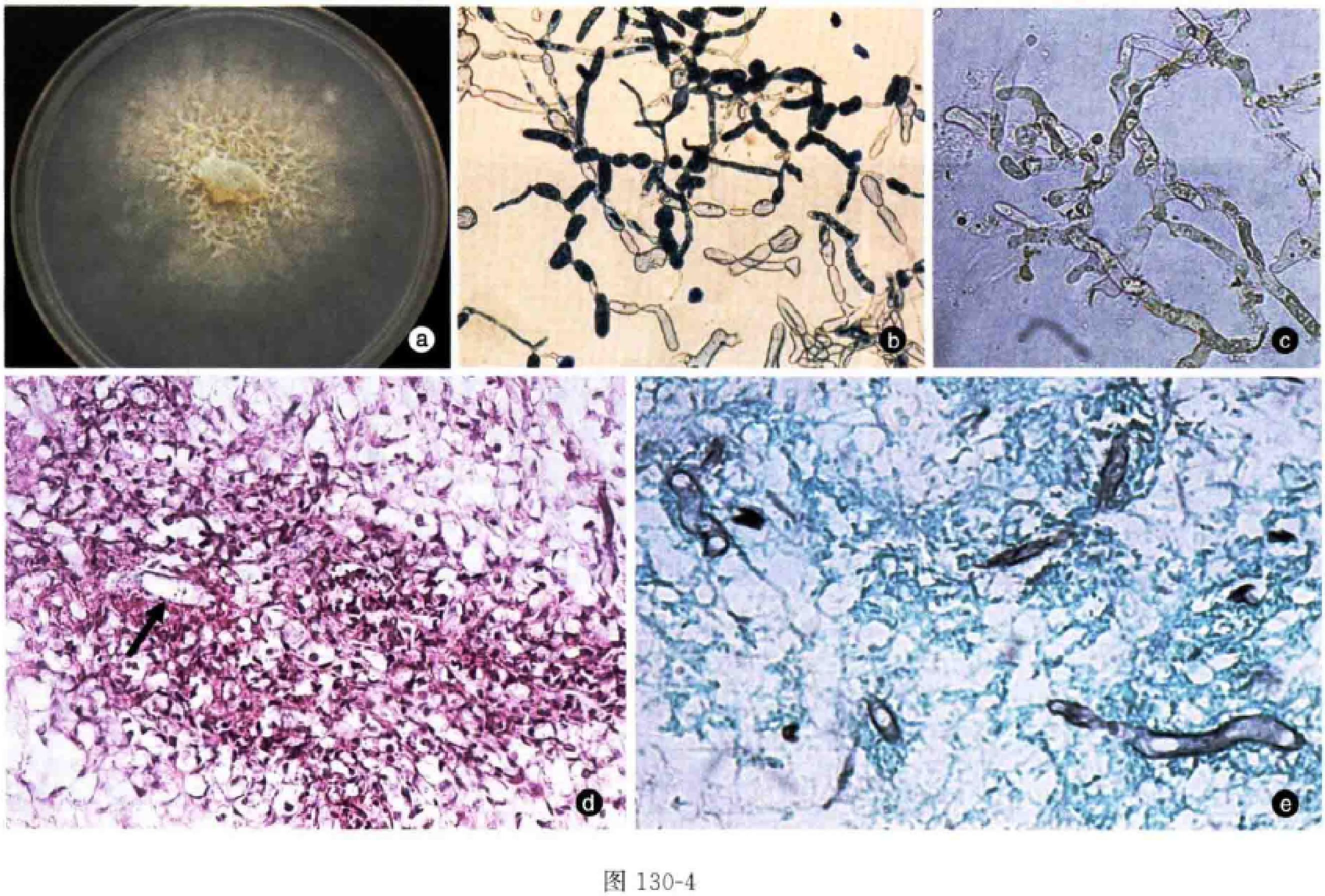


图 130-4

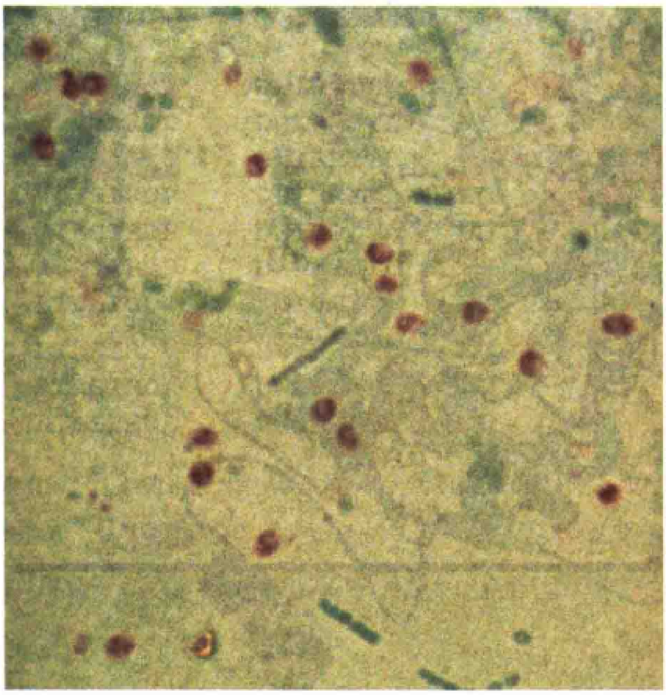


图 131-3

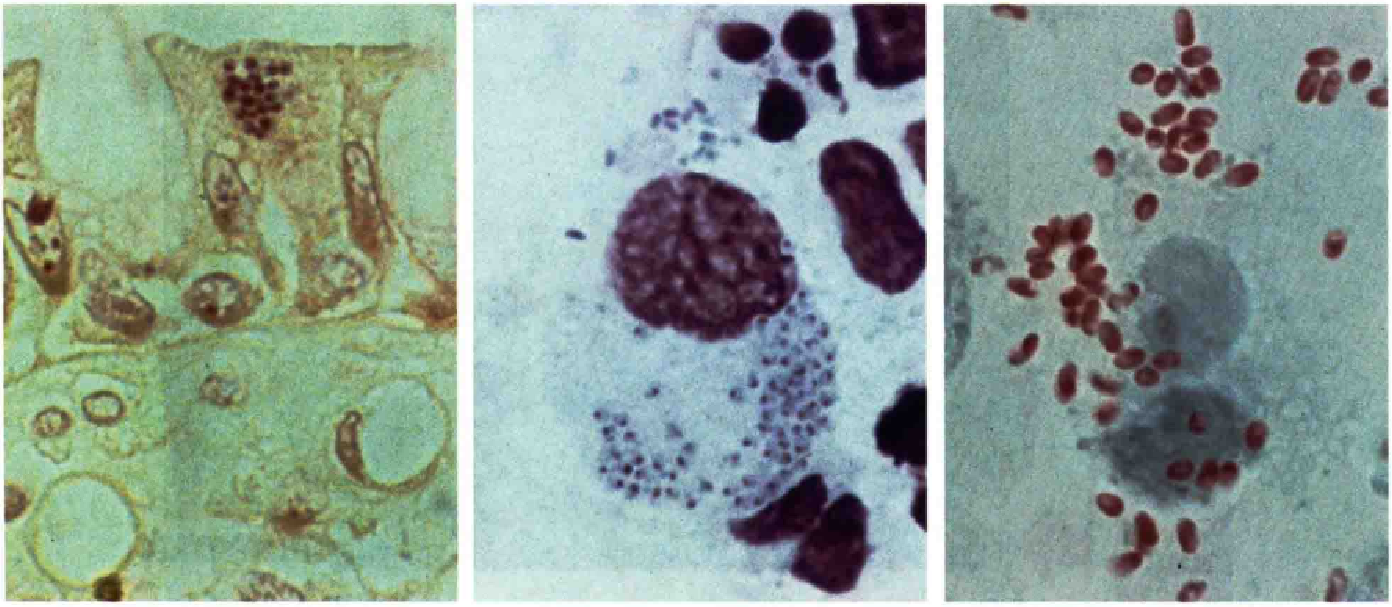


图 131-4

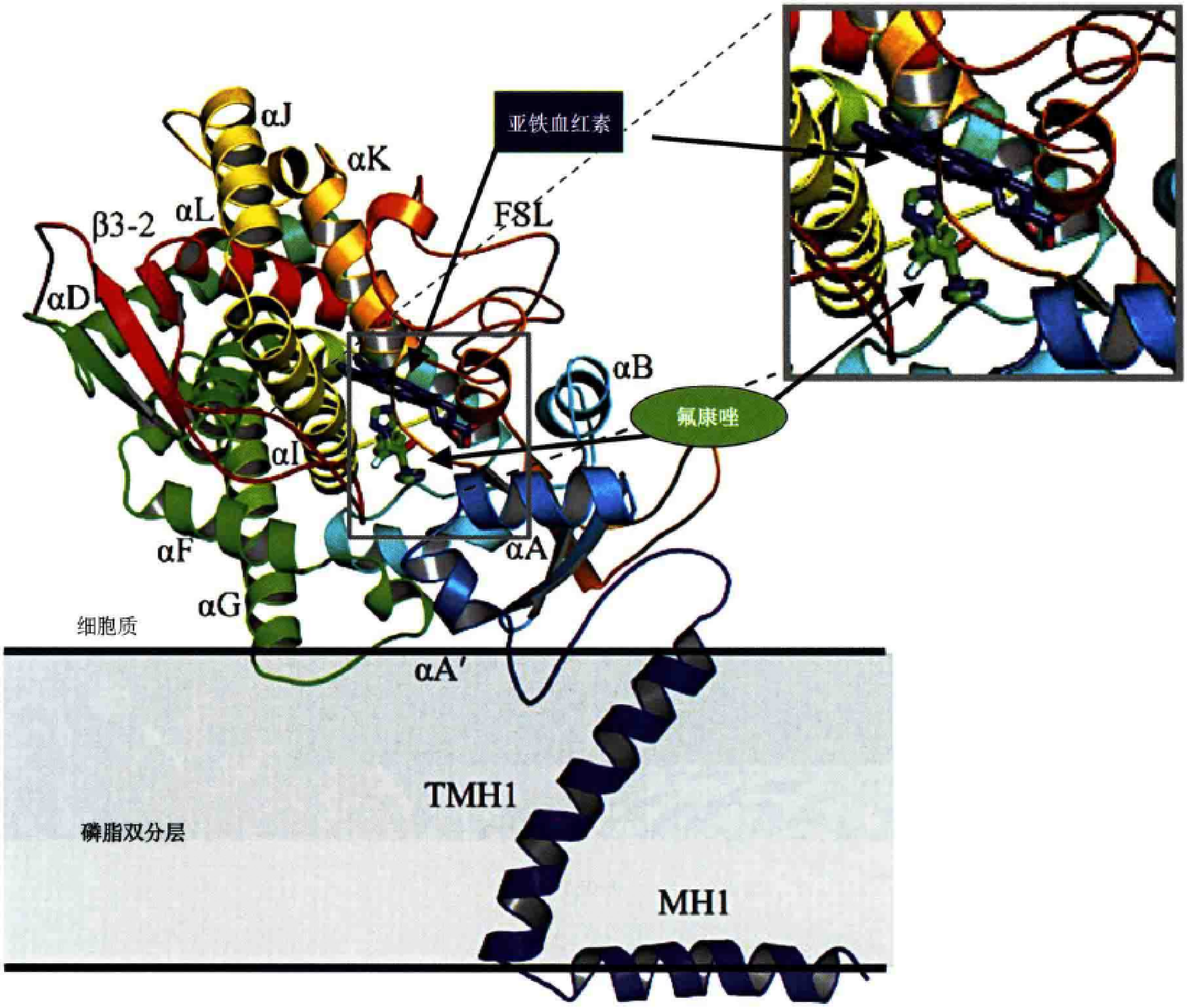

αJ
αK
亚铁血红素
β3-2
αL
F8L
αD
αB
氟康唑
αI
αF
αA
αG
细胞质
αA′
TMH1
磷脂双分层
MH1

图 133-1

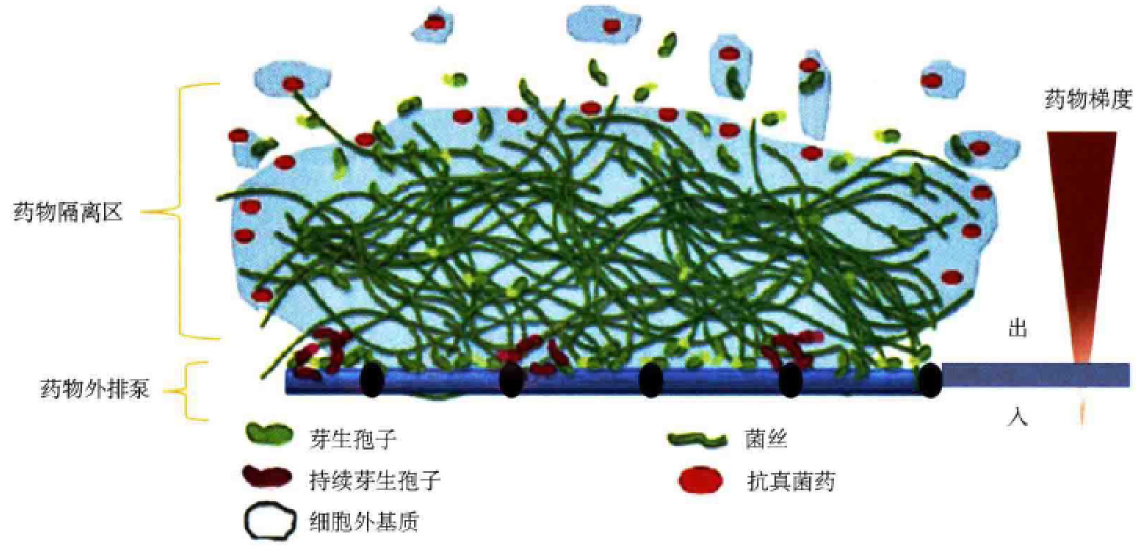

药物梯度
药物隔离区
出
药物外排泵
入
芽生孢子
菌丝
持续芽生孢子
抗真菌药
细胞外基质

图 133-2

微生物	Fks1 热点1	Fks1 热点2	Fks2 热点1	Fks2 热点2	Fks3 热点1
白色念珠菌	F_{641}LTLSLRDP	DWIRRYTL	NO	NO	NO
克柔念珠菌	F_{655}LILSIRDP	DWIRRYTL	NO	NO	NO
光滑念珠菌	F_{625}LILSIRDP	DWIRRYTL	F_{659}LILSLRDP	DWIRRYTL	NO
季也蒙毕赤酵母菌	F_{632}MALSIRDP	DWIRRYTL	NO	NO	NO
解脂假丝酵母菌	F_{662}LILSIRDP	DWIRRCVL	NO	NO	NO
热带念珠菌	F---LTLSIRDP	DWIRRYTL	NO	NO	NO
都柏林念珠菌	F_{641}LTLSIRDP	DWIRRYTL	NO	NO	NO
近平滑假丝酵母菌*	F_{652}LTLSIRDA	DWIRRYTL	NO	NO	NO
拟平滑假丝酵母菌	F---LTLSIRDA	DWVRRYTL	NO	NO	NO
似平滑念珠菌	F---LTLSIRDA	DWIRRYTL	NO	NO	NO

NO: 未观察到　　*近平滑念珠菌狭义株　　----不完整序列名称

获得性突变强耐药　　获得性突变弱耐药　　自然发生的多态性

图 133-3

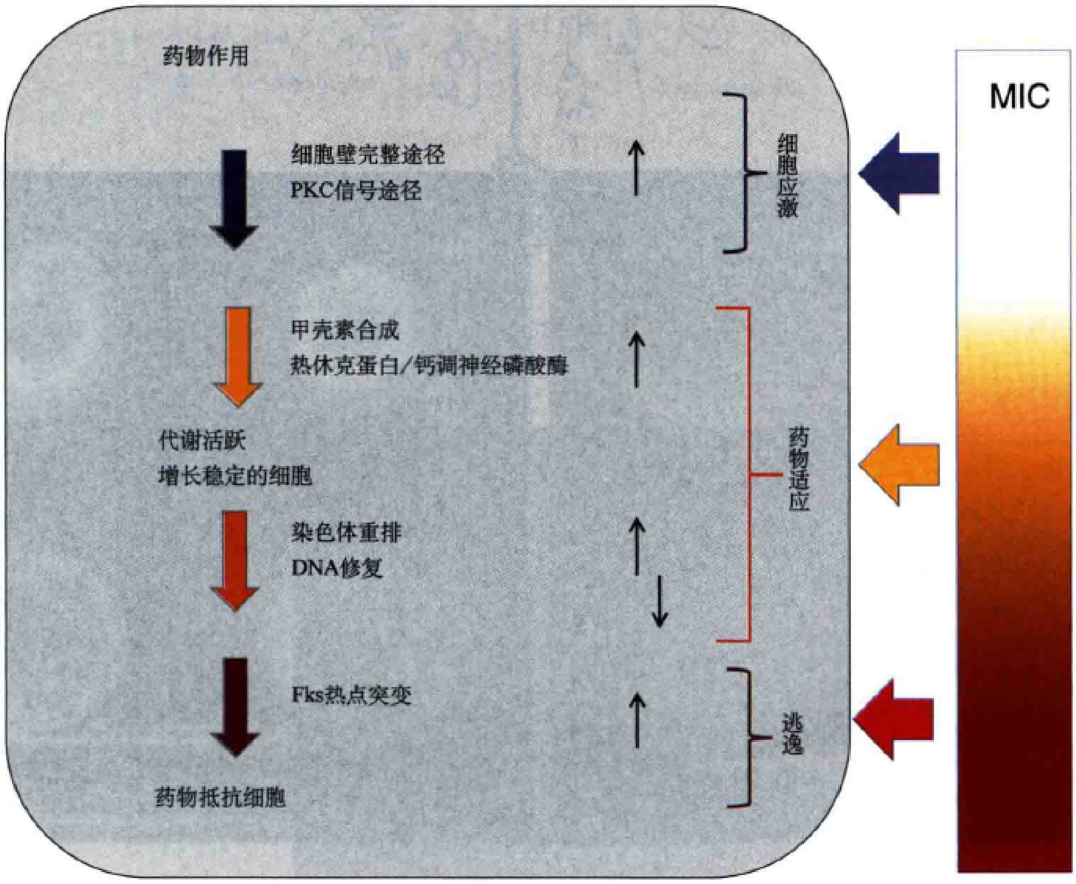


图 133-4

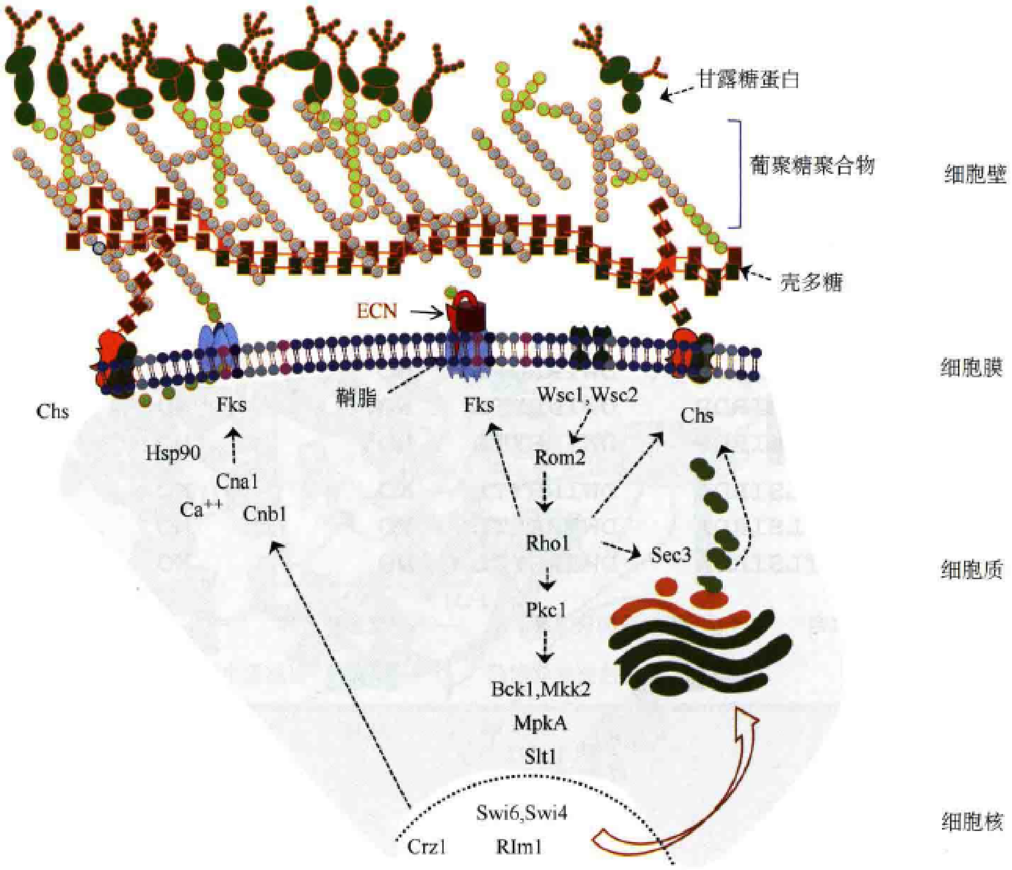

甘露糖蛋白
葡聚糖聚合物
细胞壁
壳多糖
ECN
细胞膜
Chs
Fks
鞘脂
Fks
Wsc1,Wsc2
Chs
Hsp90
Cna1
Ca++
Cnb1
Rom2
Rho1
Sec3
细胞质
Pkc1
Bck1,Mkk2
MpkA
Slt1
Swi6,Swi4
Crz1
Rlm1
细胞核

图 133-5

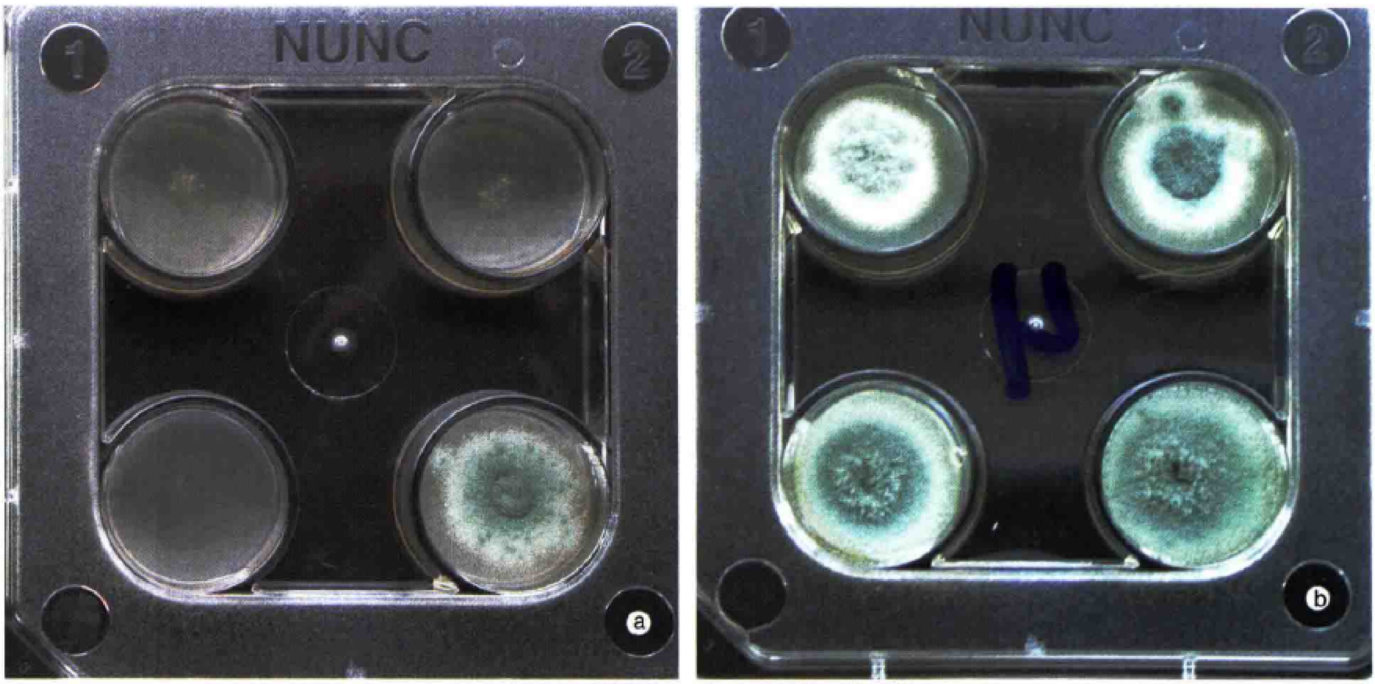

NUNC
1
2
a
NUNC
1
2
b

图 134-1

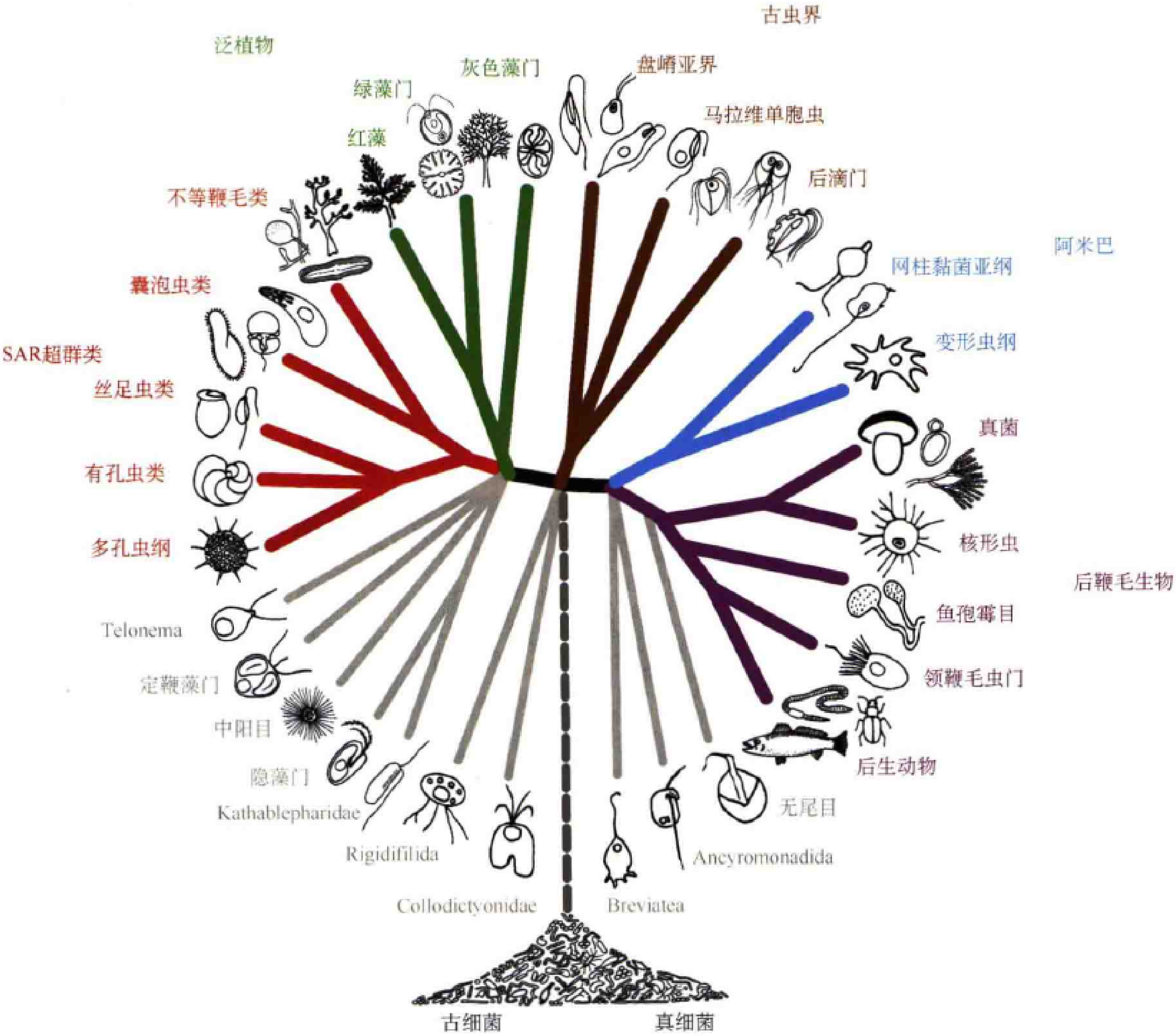

古虫界
泛植物
灰色藻门
盘嵴亚界
绿藻门
马拉维单胞虫
红藻
后滴门
不等鞭毛类
阿米巴
网柱黏菌亚纲
囊泡虫类
变形虫纲
SAR超群类
丝足虫类
真菌
有孔虫类
核形虫
多孔虫纲
后鞭毛生物
Telonema
鱼孢霉目
定鞭藻门
领鞭毛虫门
中阳目
隐藻门
后生动物
Kathablepharidae
无尾目
Rigidifilida
Ancyromonadida
Collodictyonidae
Breviatea
古细菌
真细菌

图 135-1

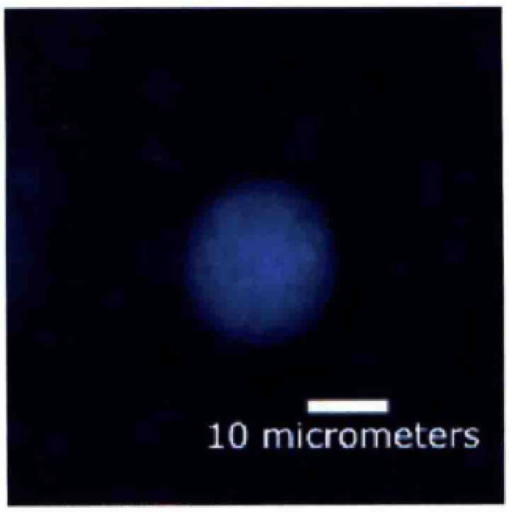

10 micrometers

图 137-1

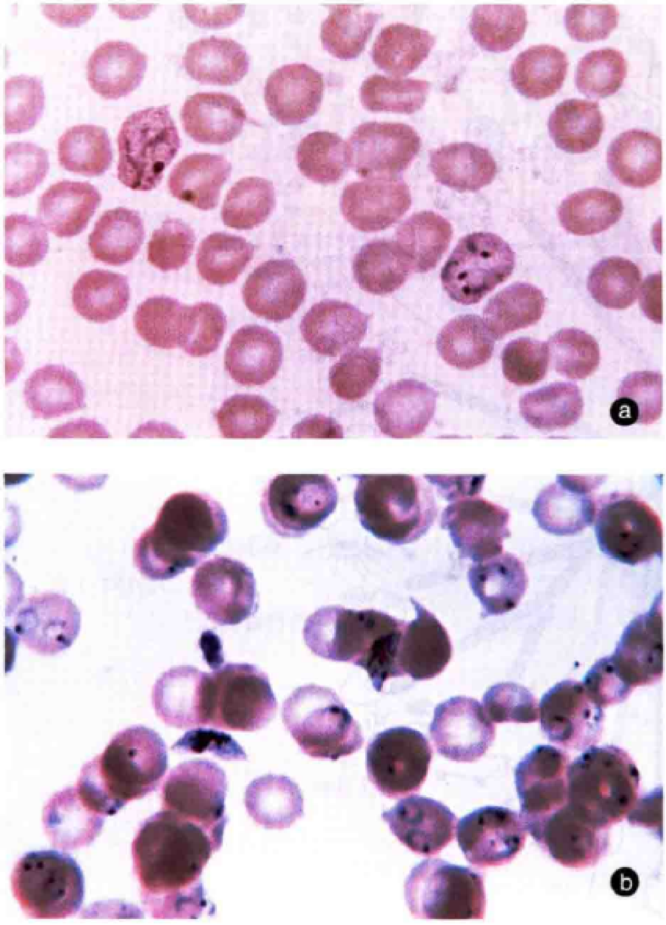


图 137-2



图 137-3

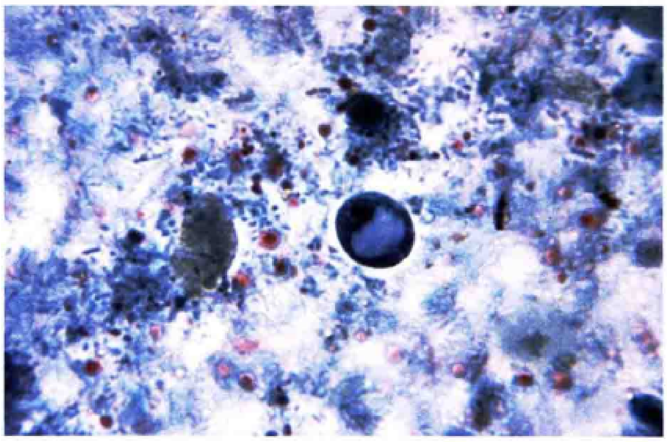


图 137-4



图 137-5

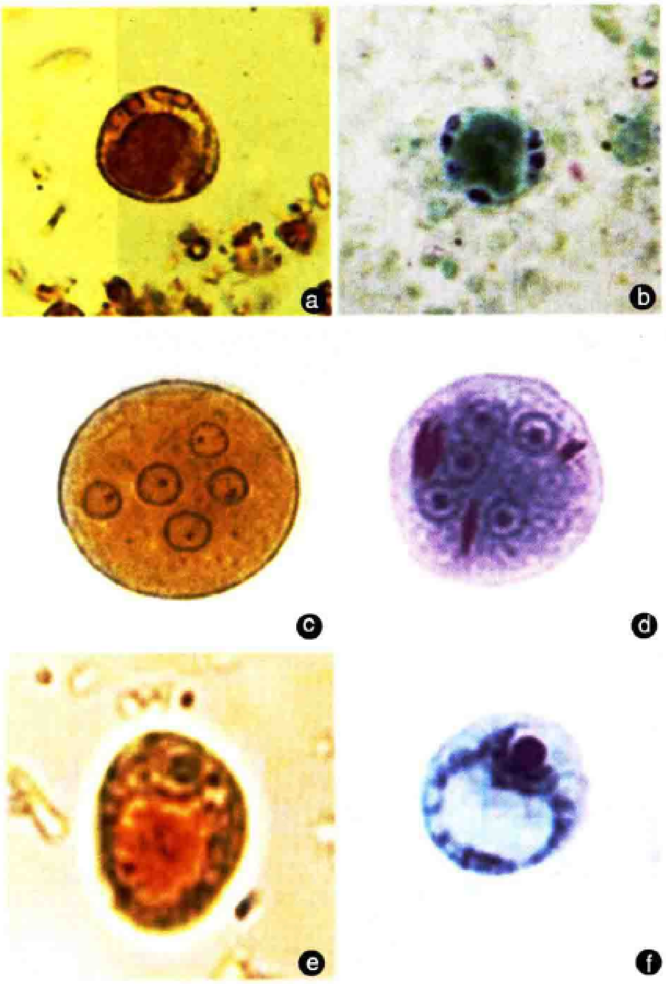


图 138-4

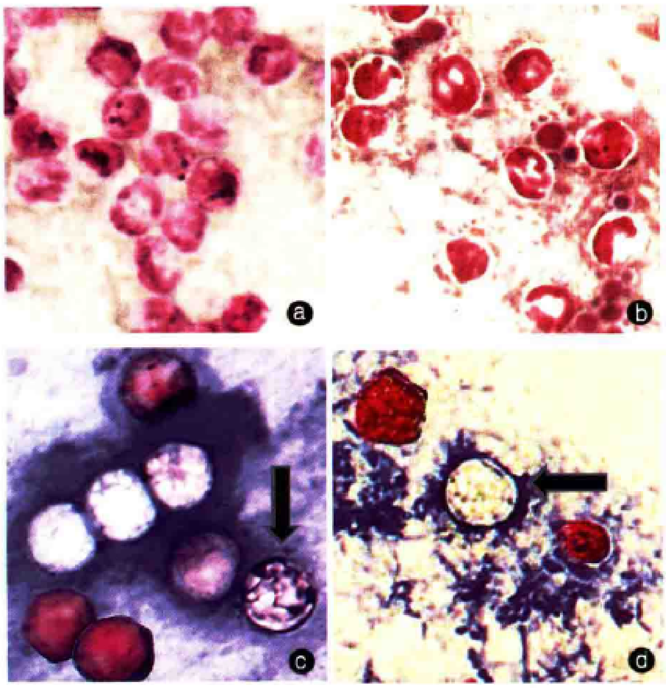


图 138-5

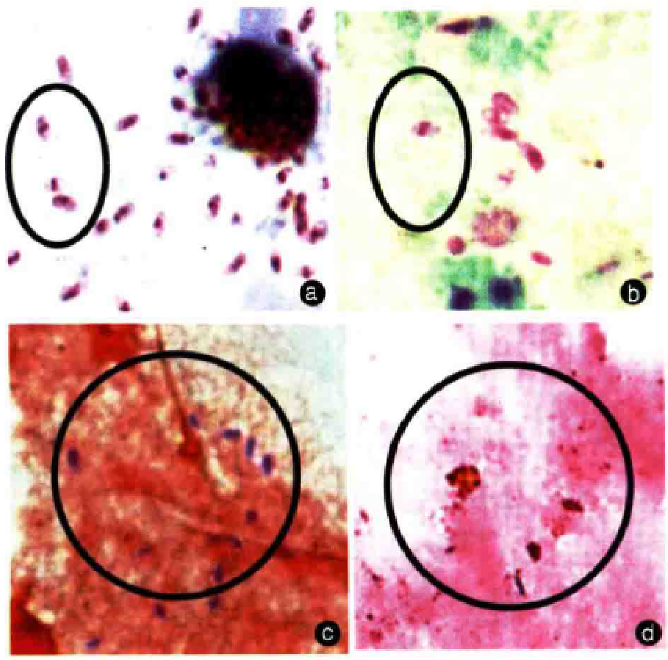


图 138-6

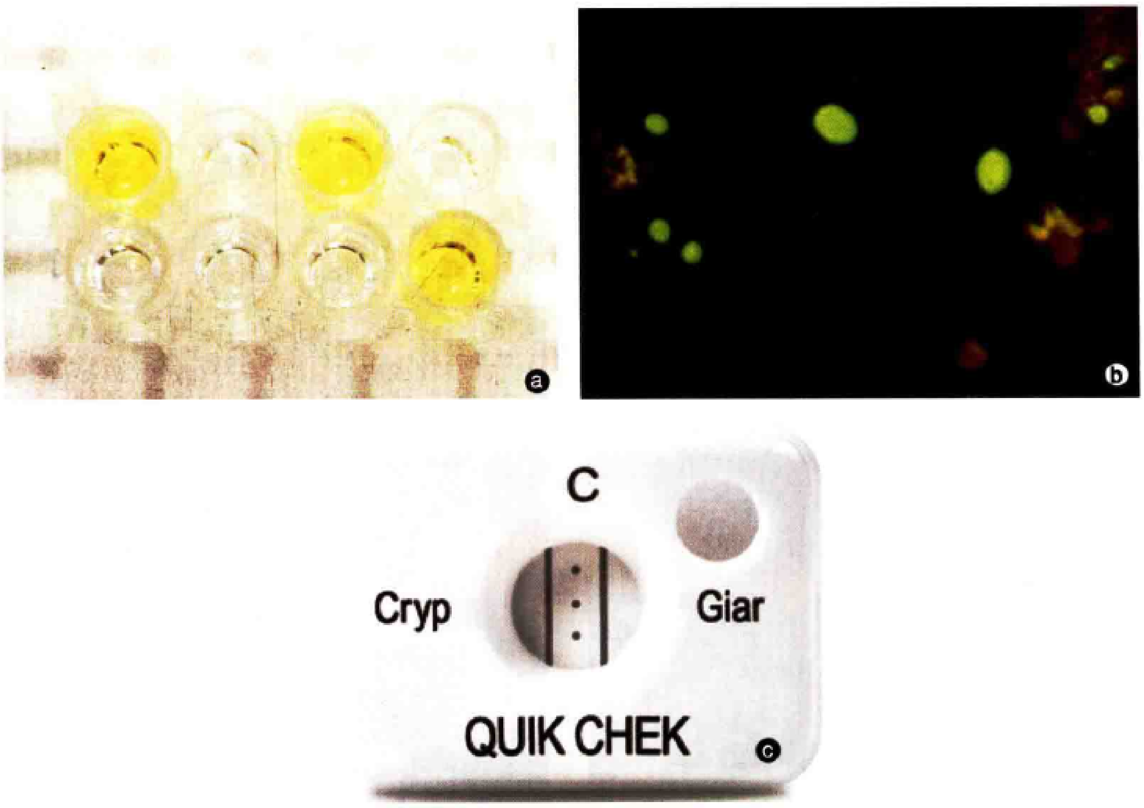

C
Cryp
Giar
QUIK CHEK

图 138-7

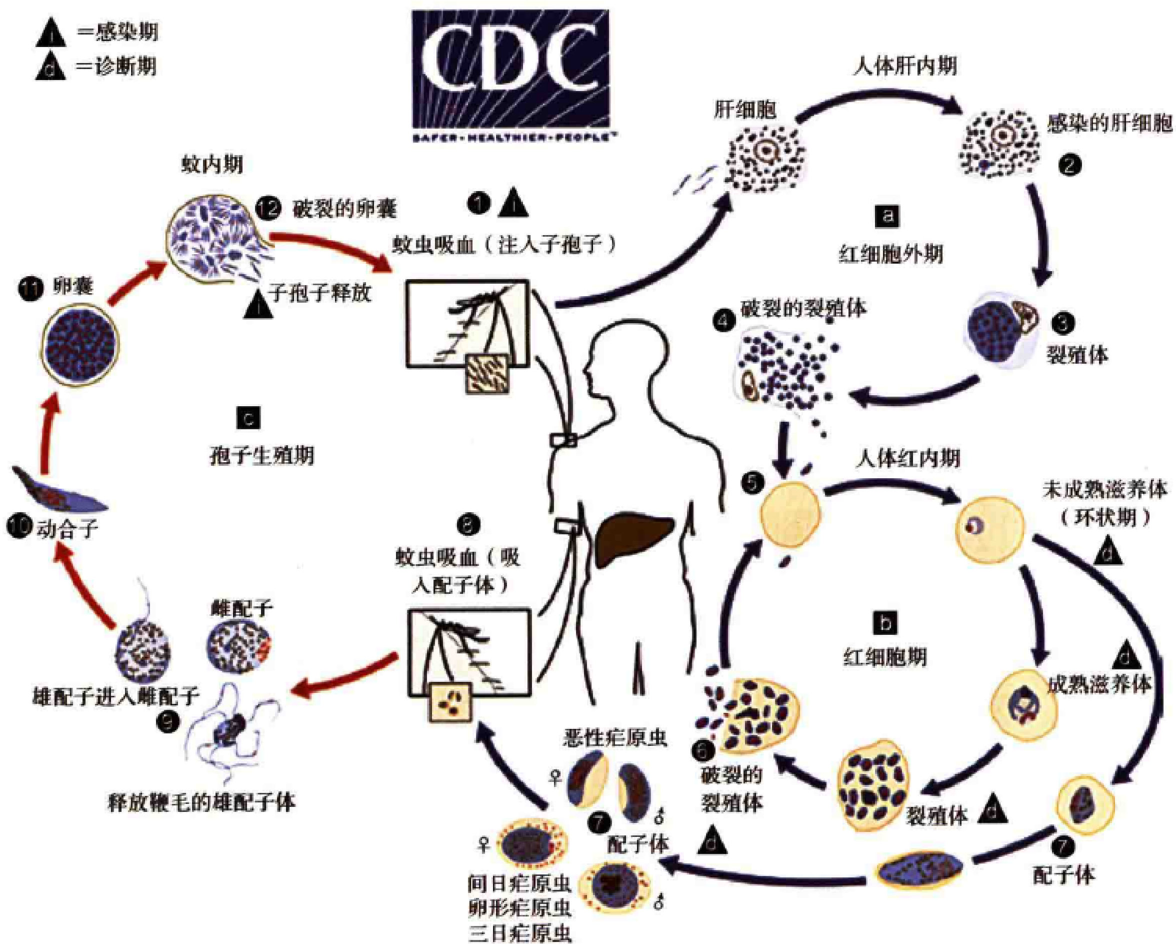

=感染期
=诊断期
CDC
人体肝内期
肝细胞
感染的肝细胞
蚊内期
破裂的卵囊
蚊虫吸血（注入子孢子）
红细胞外期
卵囊
子孢子释放
破裂的裂殖体
裂殖体
孢子生殖期
人体红内期
未成熟滋养体
（环状期）
动合子
蚊虫吸血（吸入配子体）
红细胞期
雌配子
成熟滋养体
雄配子进入雌配子
恶性疟原虫
破裂的裂殖体
释放鞭毛的雄配子体
裂殖体
配子体
配子体
间日疟原虫
卵形疟原虫
三日疟原虫

图 139-1

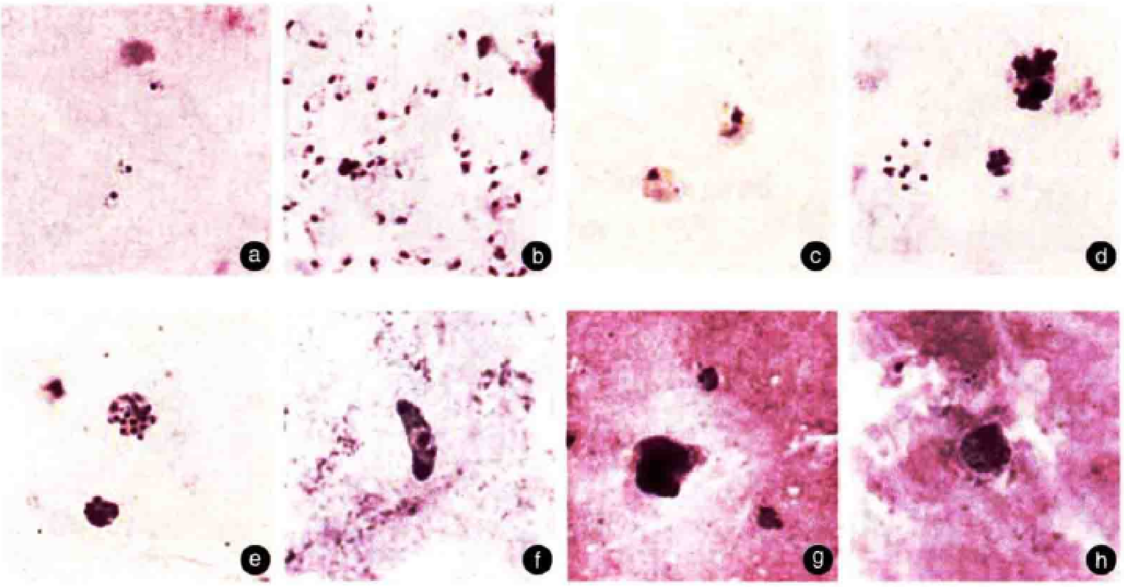


图 139-2

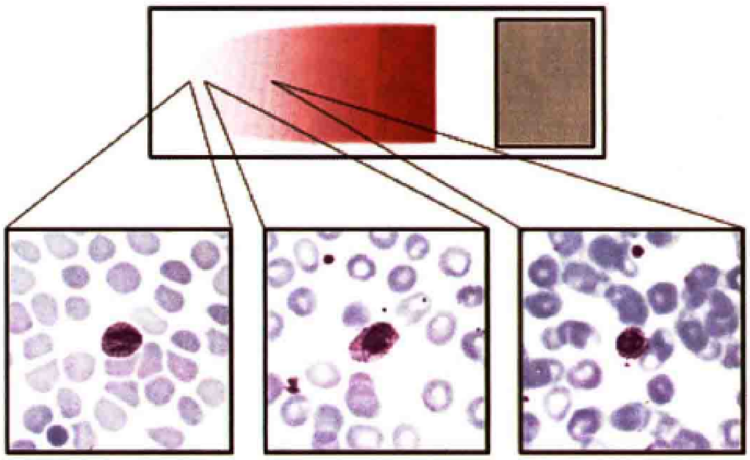


图 139-3

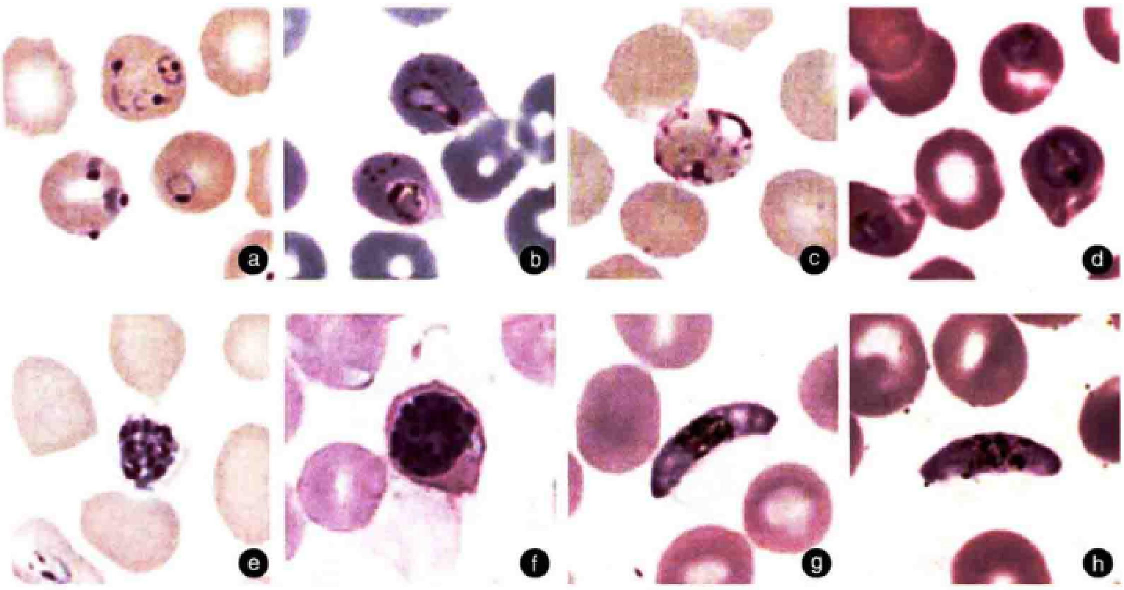


图 139-4

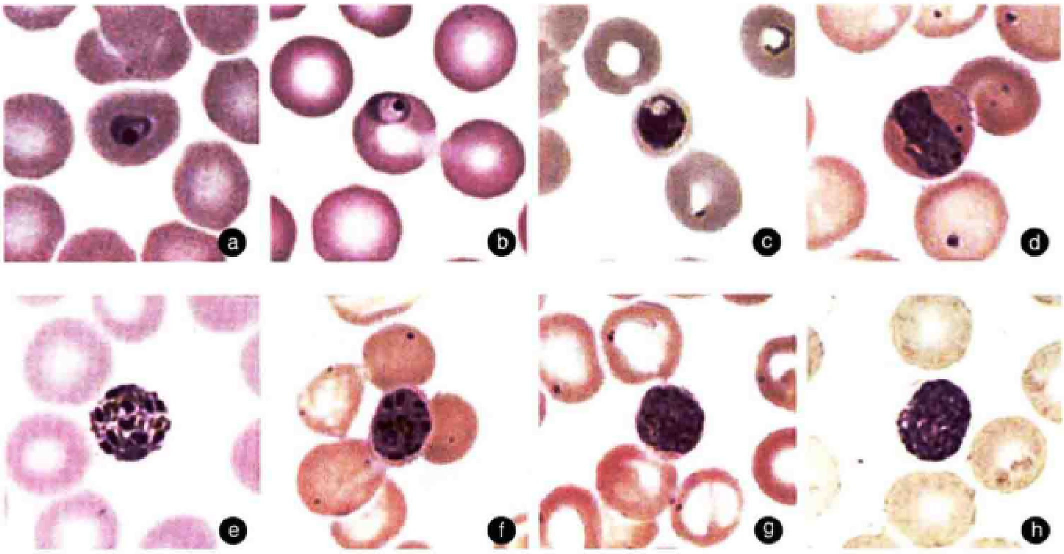


图 139-5

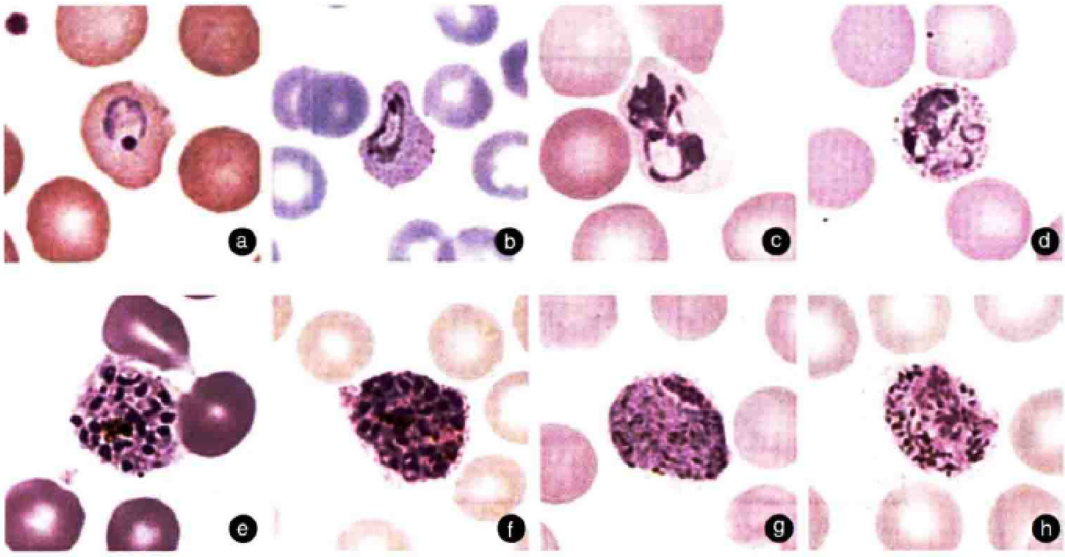


图 139-6

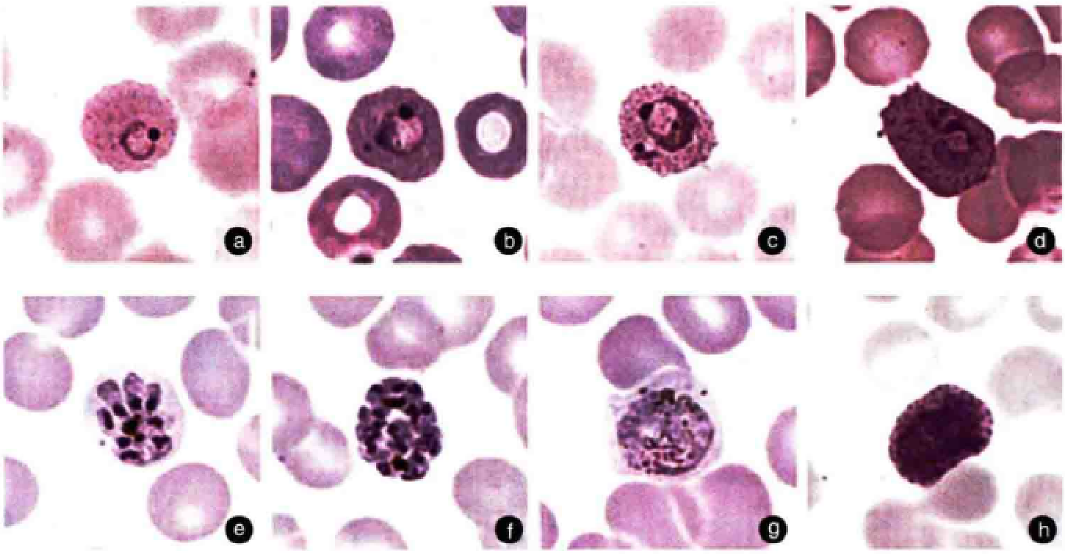


图 139-7

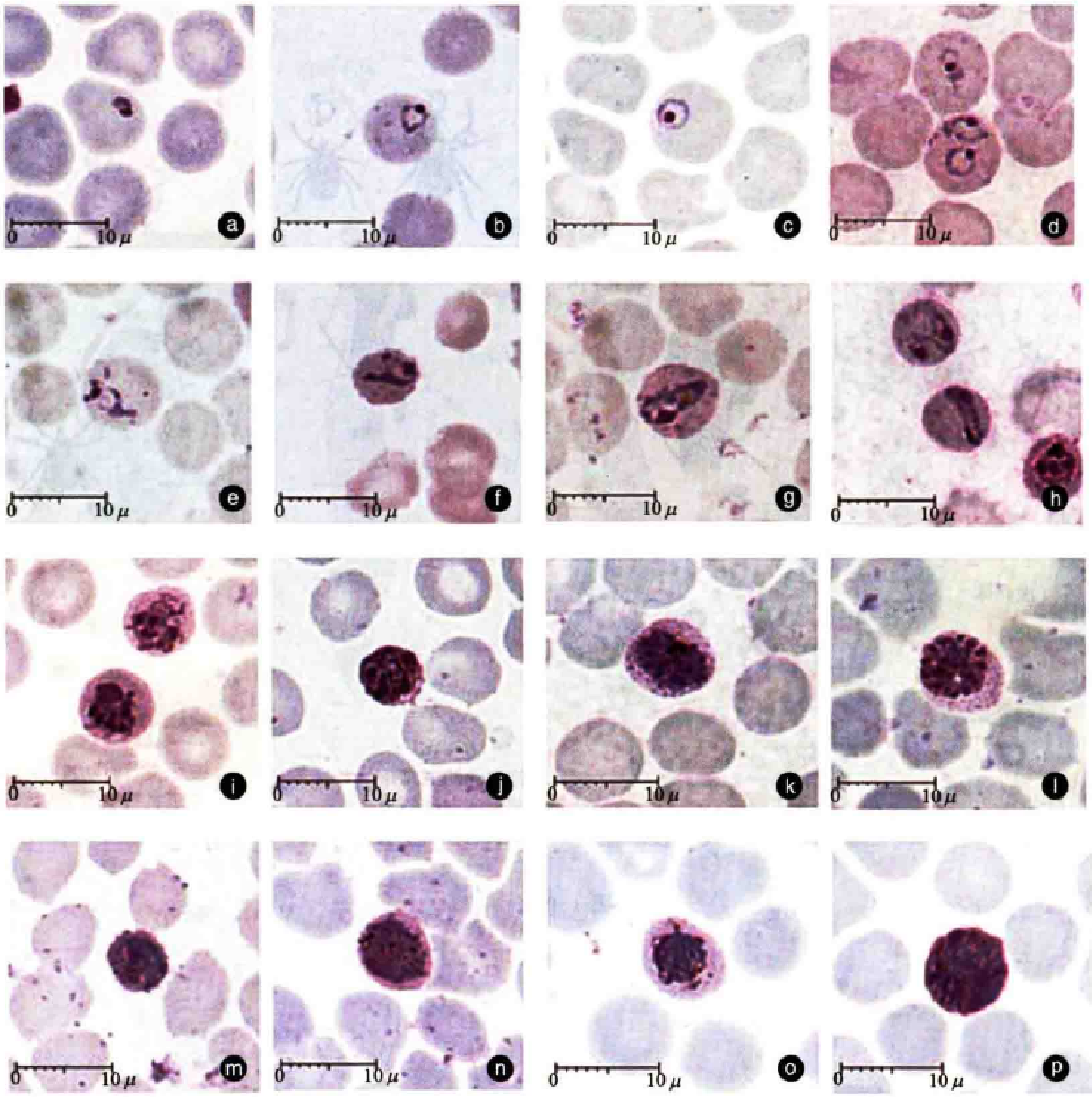

0 10μ a
0 10μ b
0 10μ c
0 10μ d
0 10μ e
0 10μ f
0 10μ g
0 10μ h
0 10μ i
0 10μ j
0 10μ k
0 10μ l
0 10μ m
0 10μ n
0 10μ o
0 10μ p

图 139-8

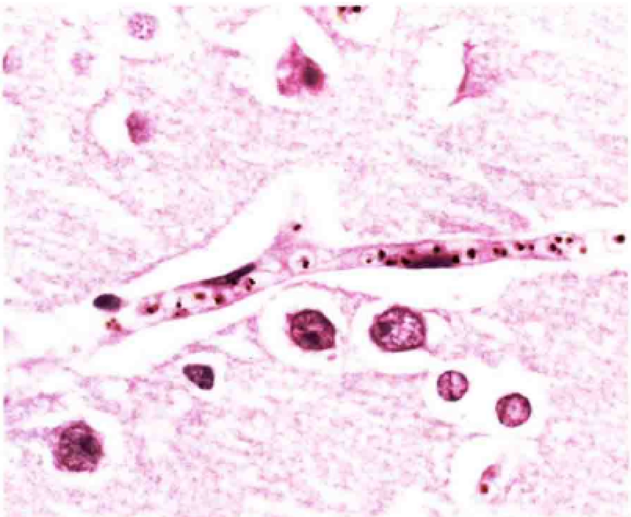


图 139-9

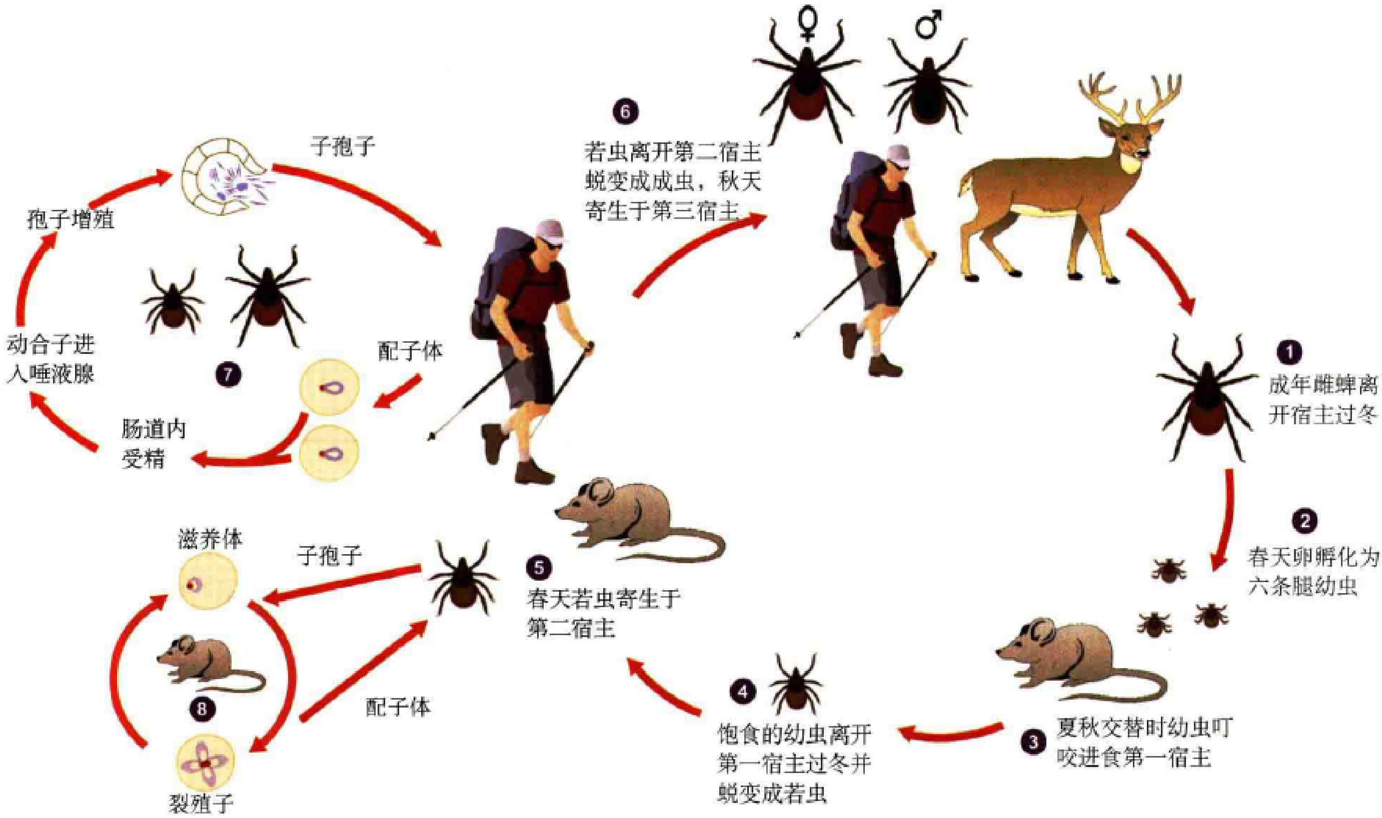


图 139-10

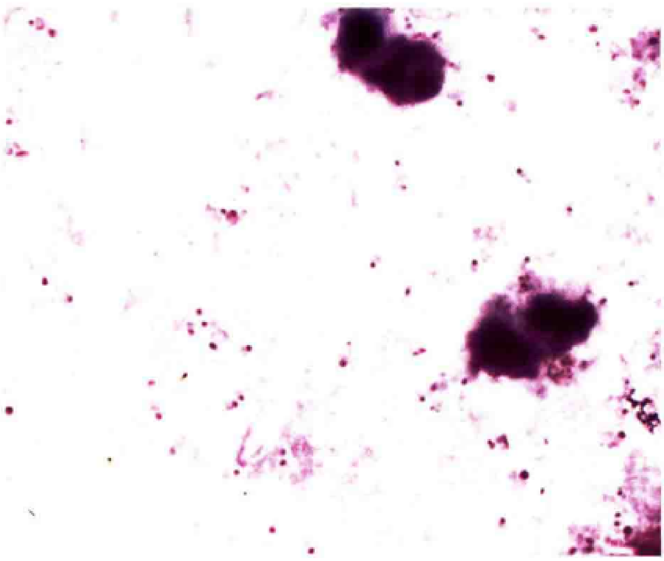


图 139-11

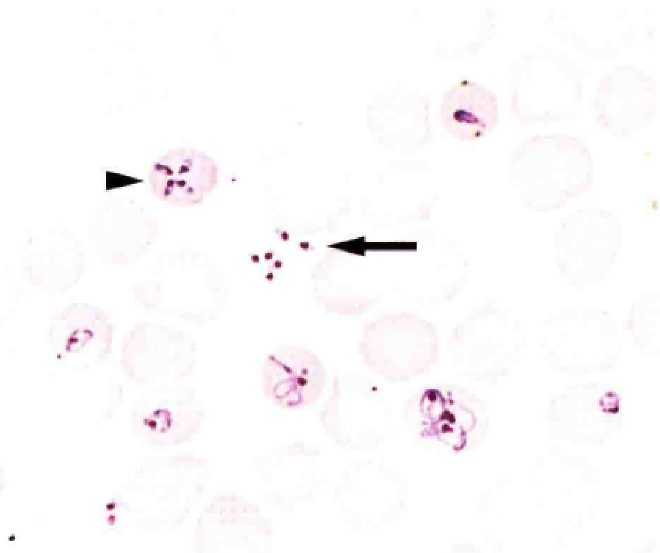


图 139-12

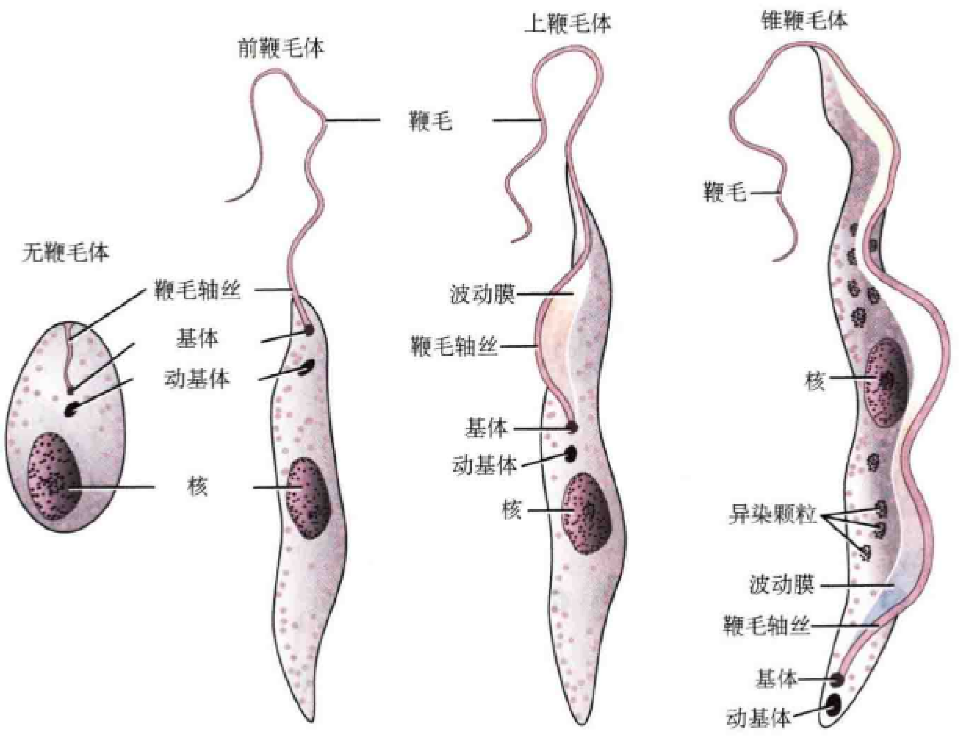


图 140-1

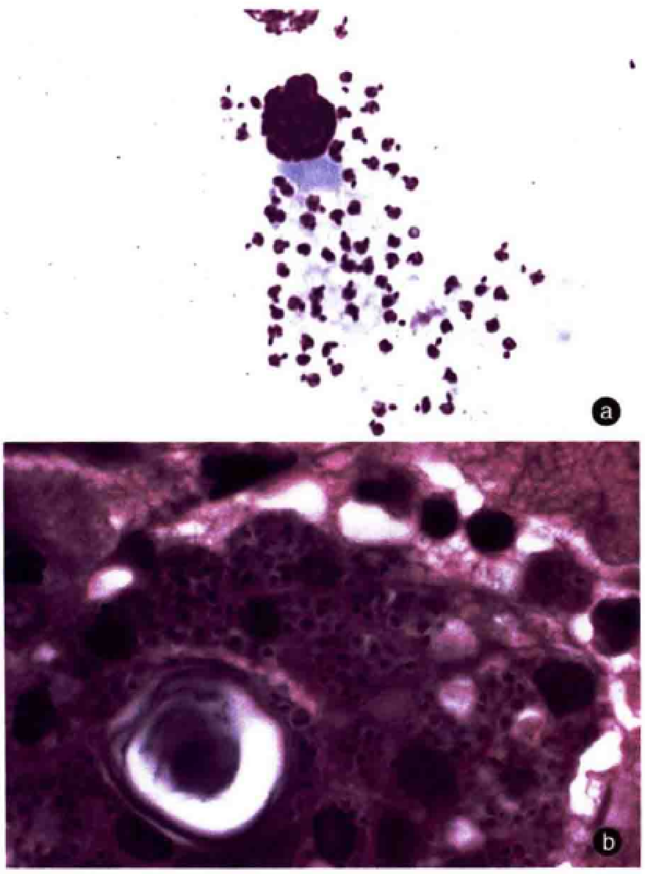


图 140-2

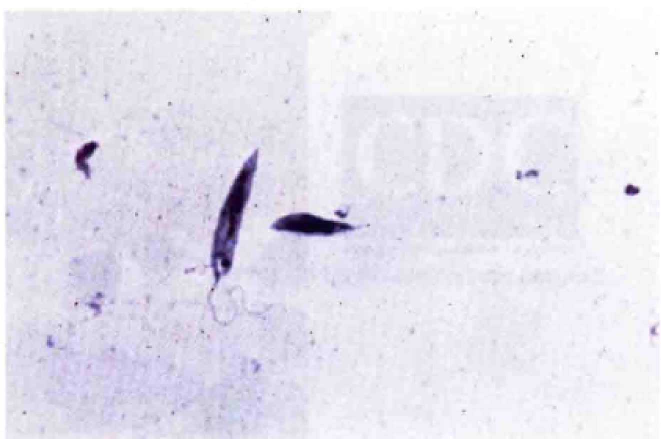


图 140-3

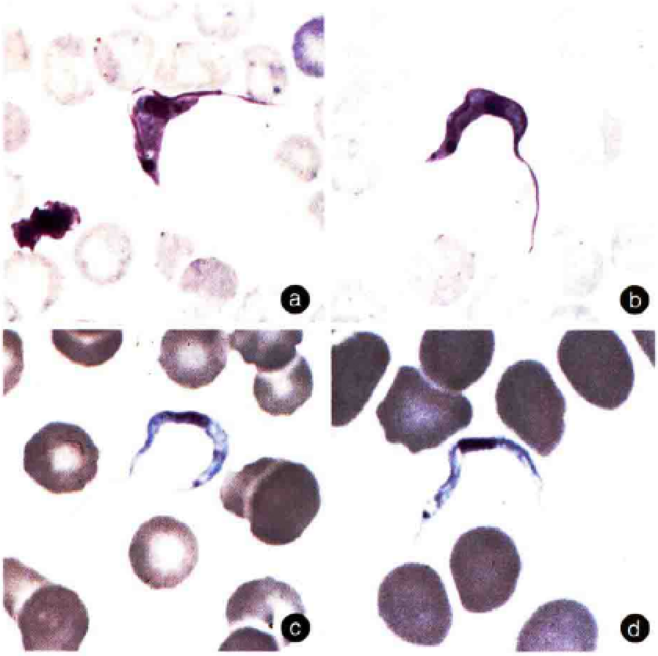


图 140-4

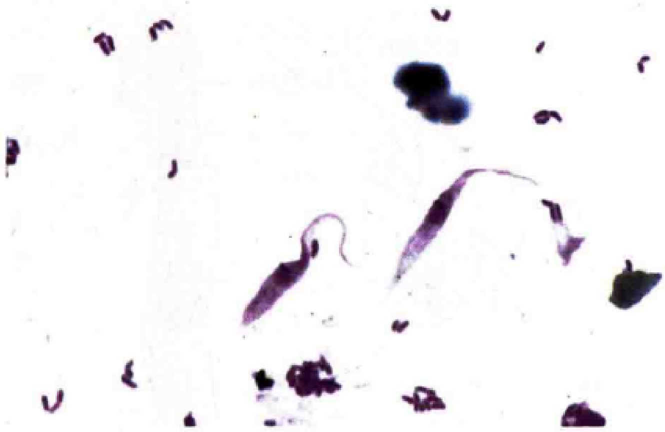


图 140-5

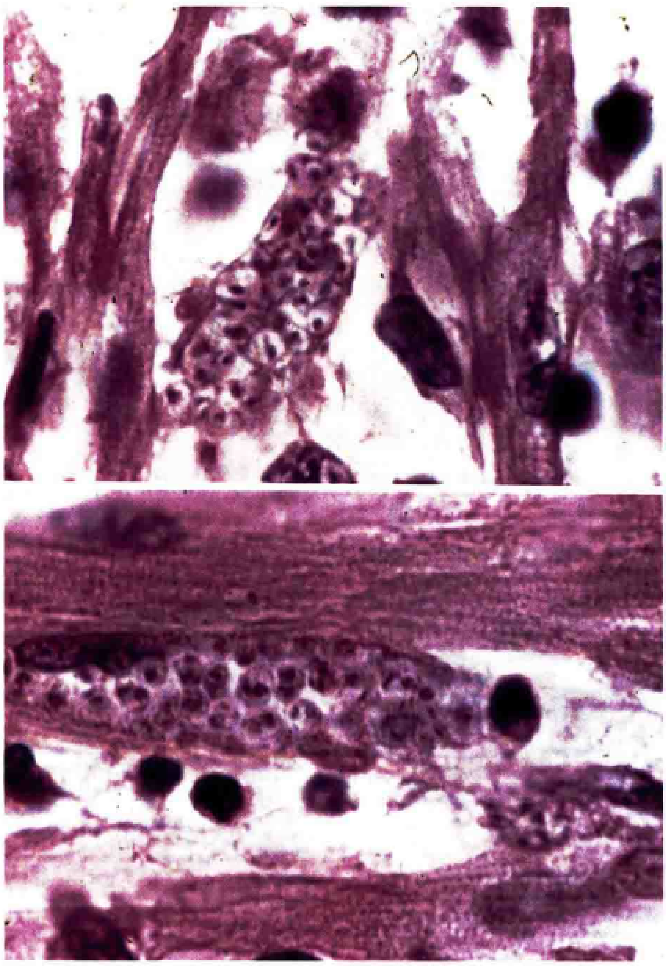


图 140-6

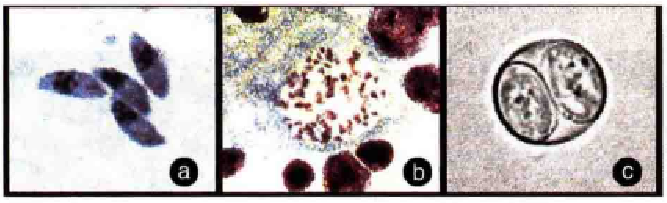

a
b
c

图 141-1

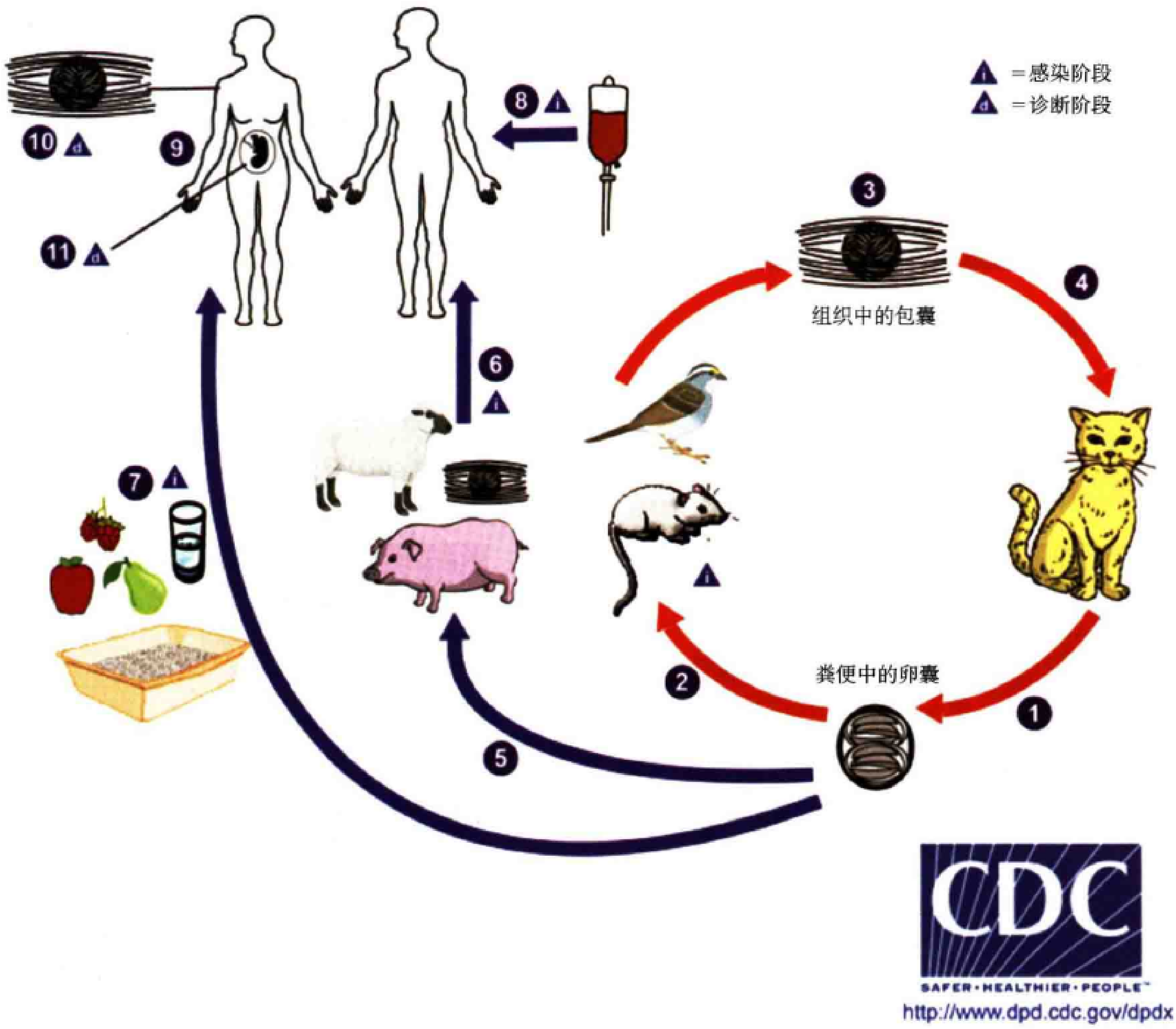

=感染阶段
=诊断阶段
组织中的包囊
粪便中的卵囊
CDC
SAFER·HEALTHIER·PEOPLE™
http://www.dpd.cdc.gov/dpdx

图 141-2

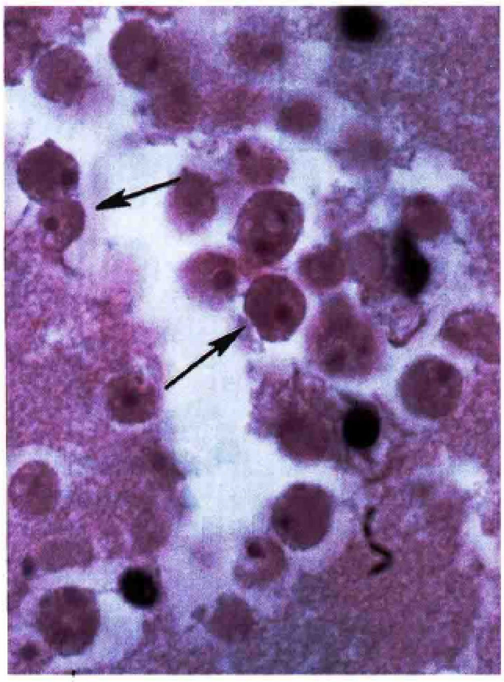


图 142-9

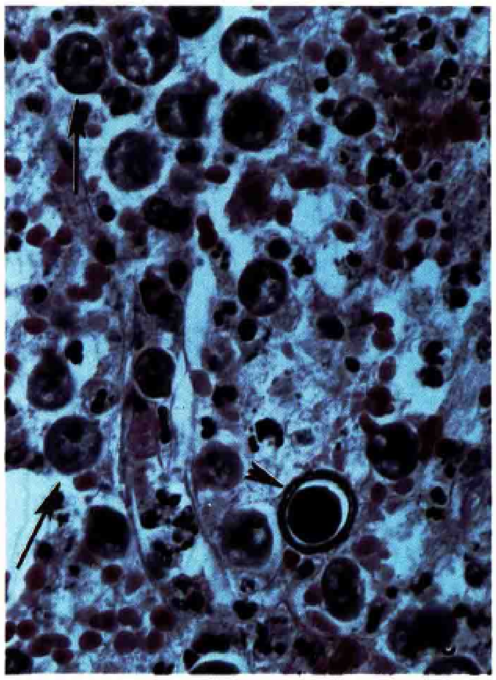


图 142-10

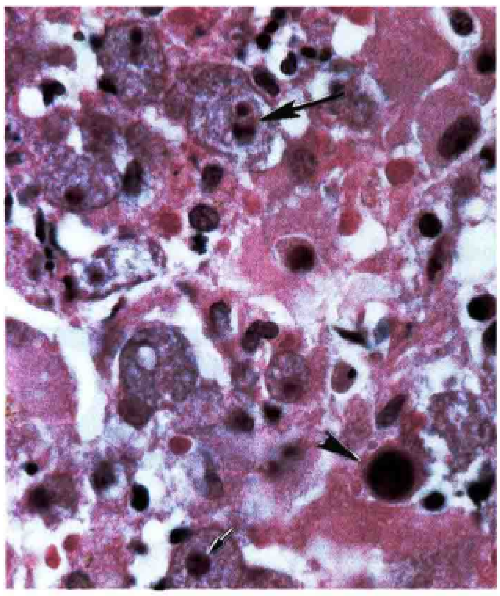


图 142-11

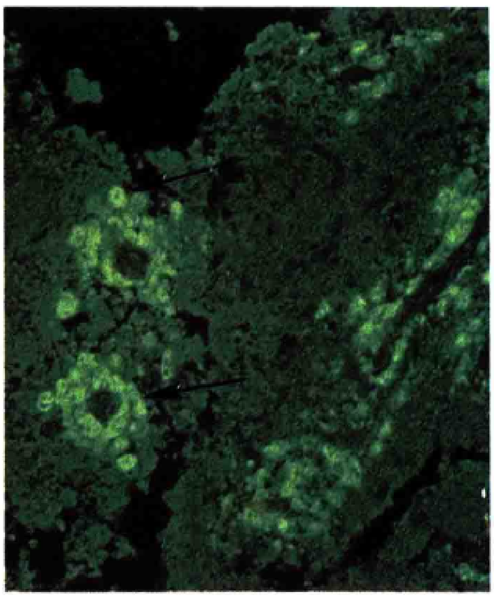


图 142-12

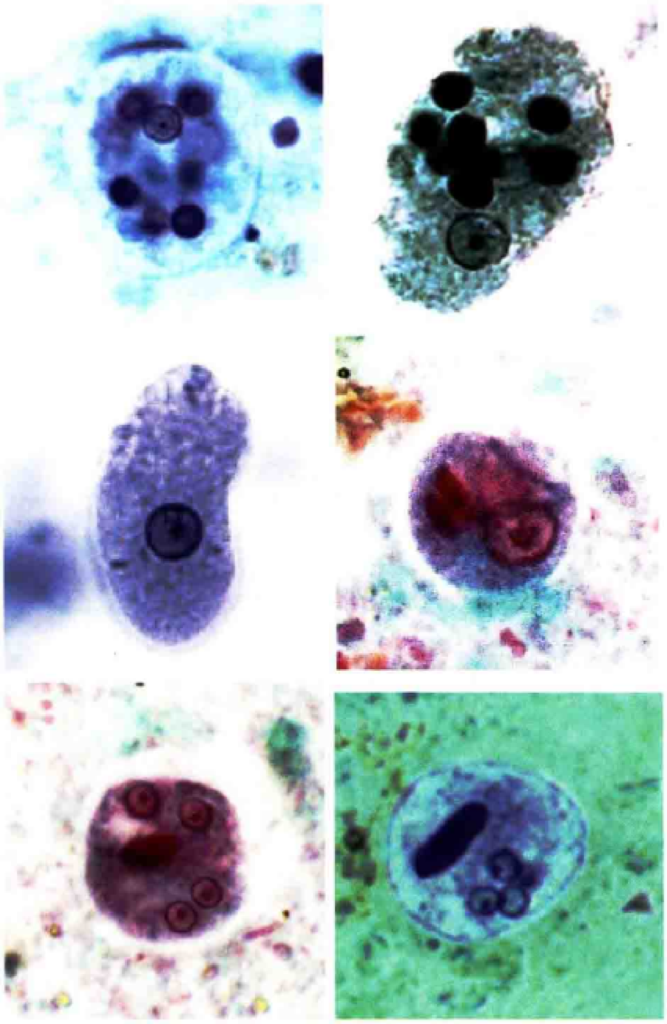


图 143-2

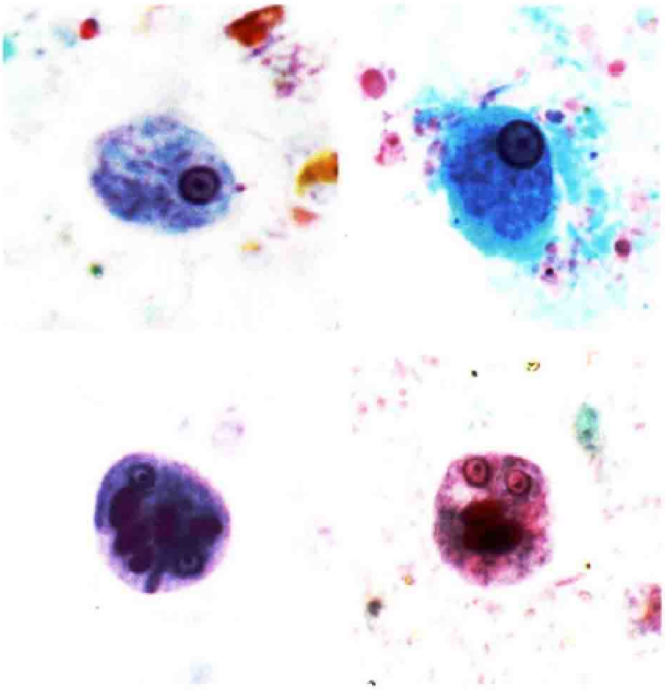


图 143-3

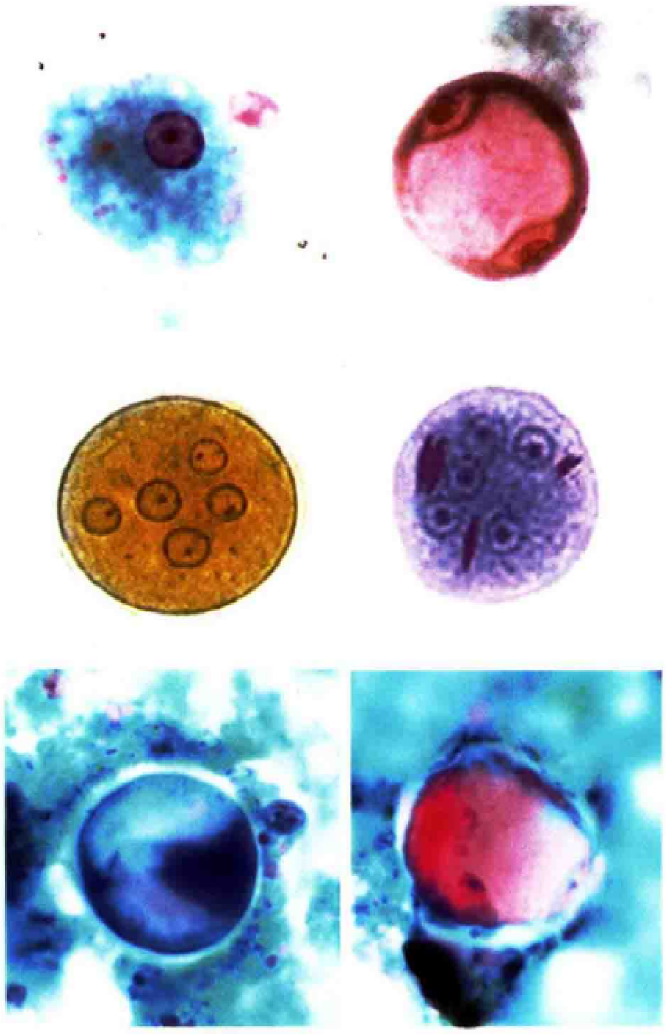


图 143-4

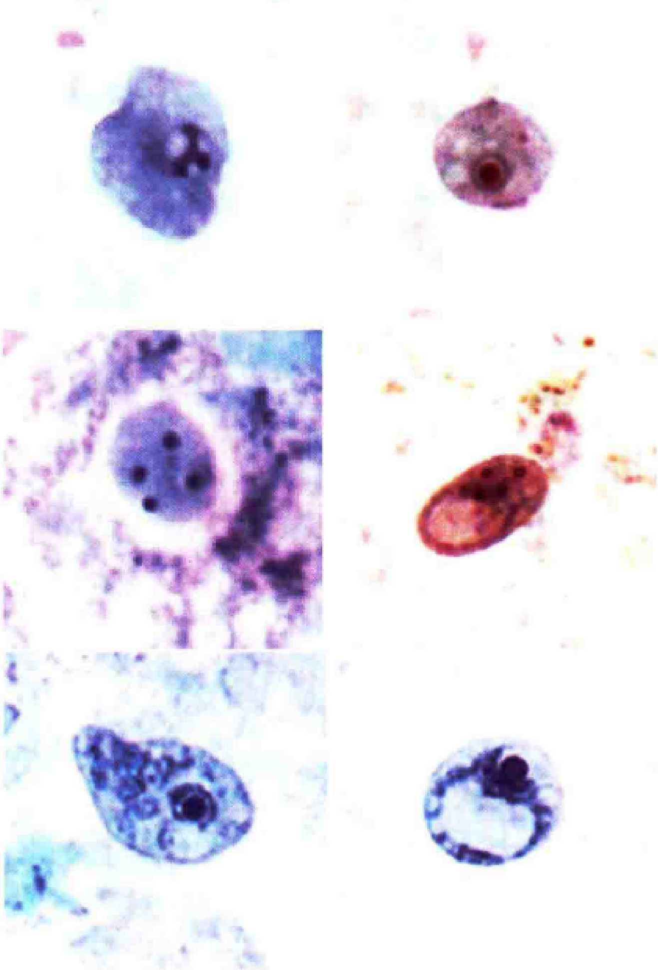


图 143-5

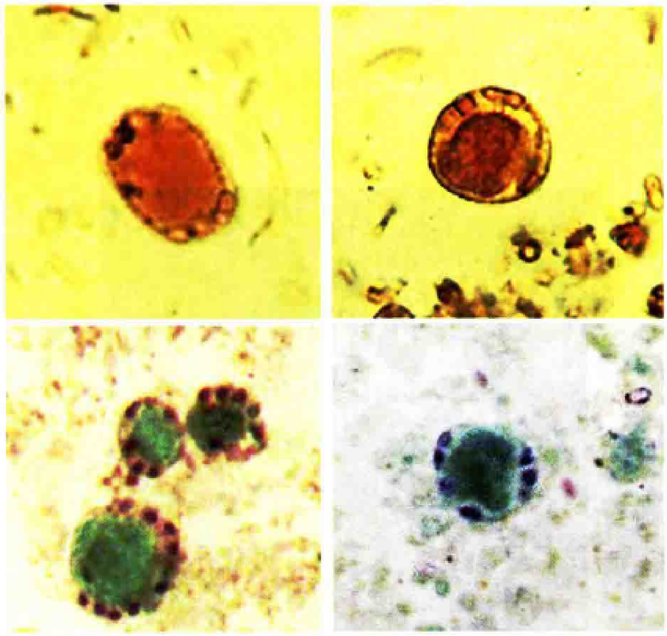


图 143-6

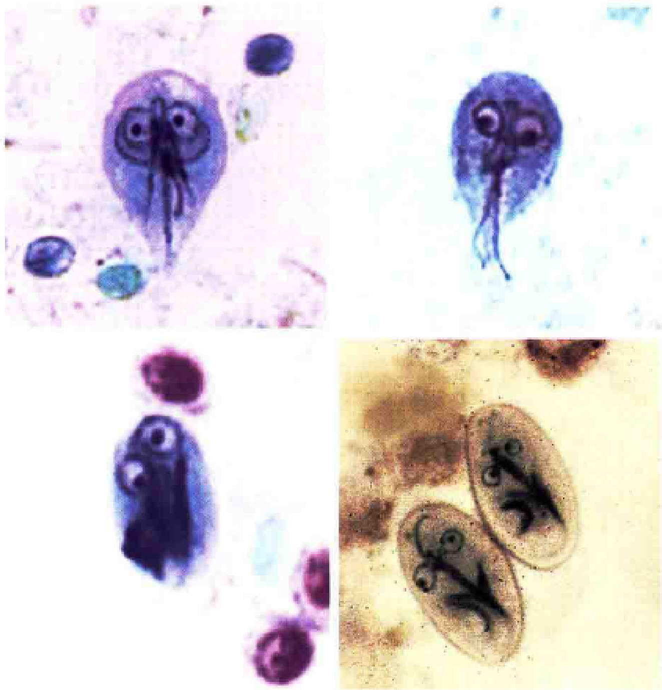


图 143-8

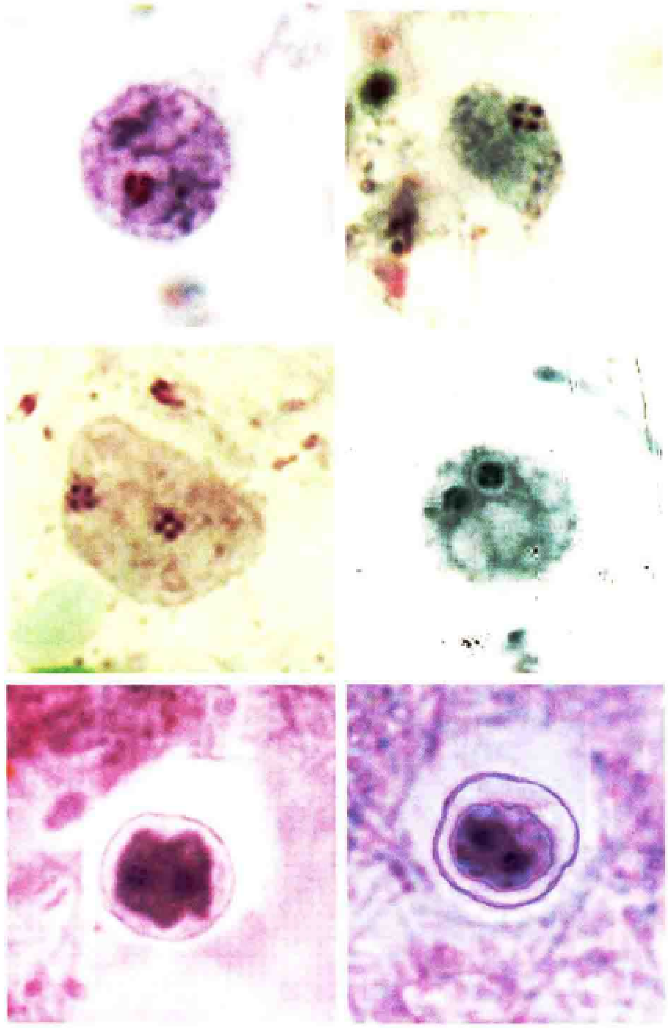


图 143-9

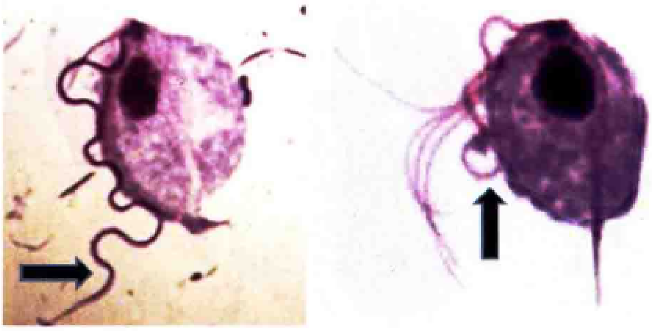


图 143-10

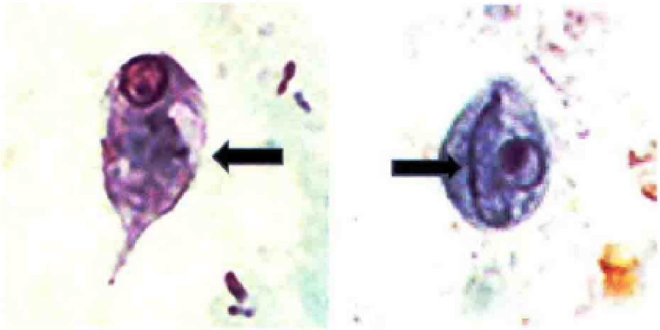


图 143-11

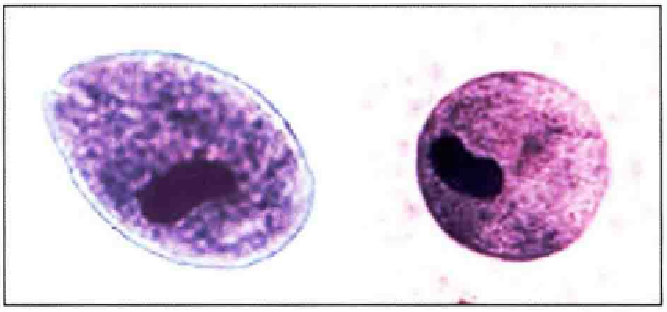


图 143-12

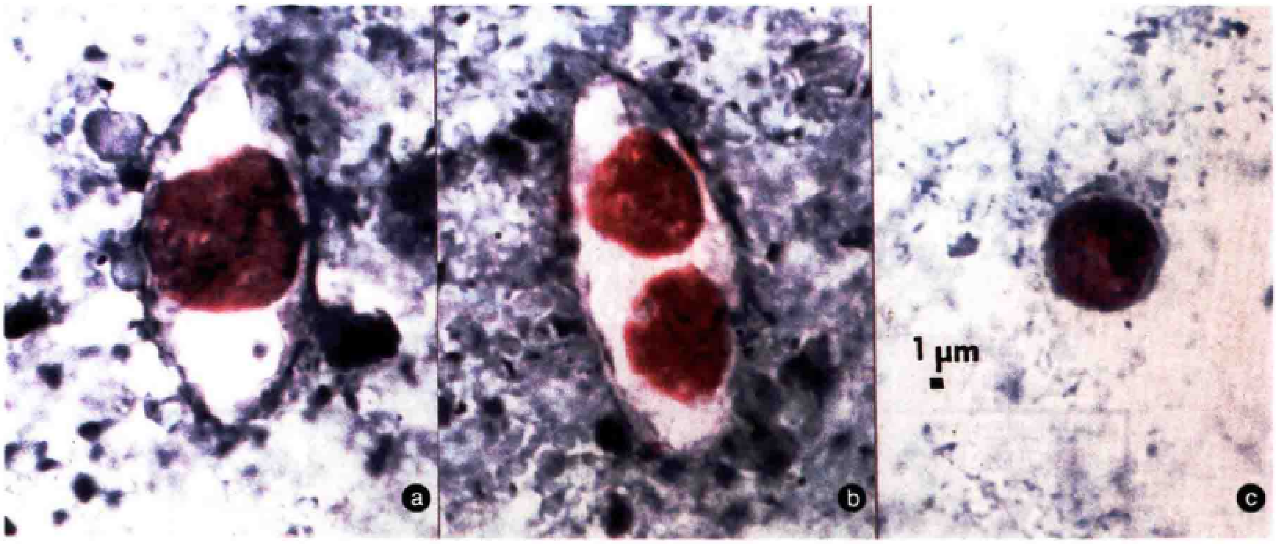


图 144-2

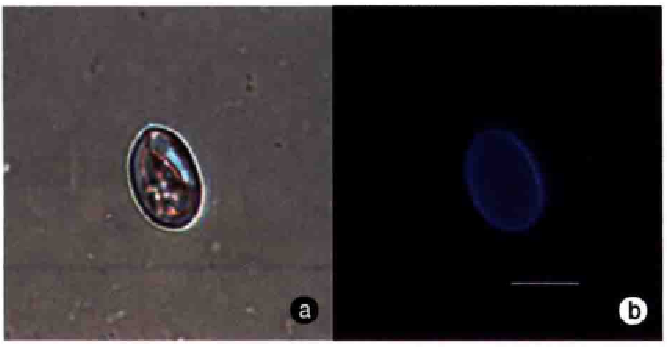


图 144-3

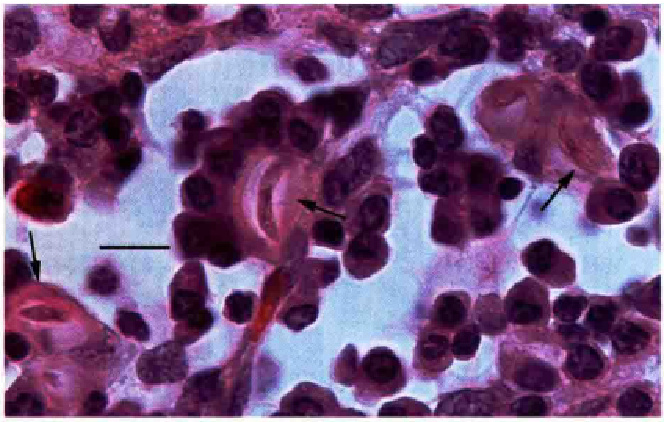


图 144-4

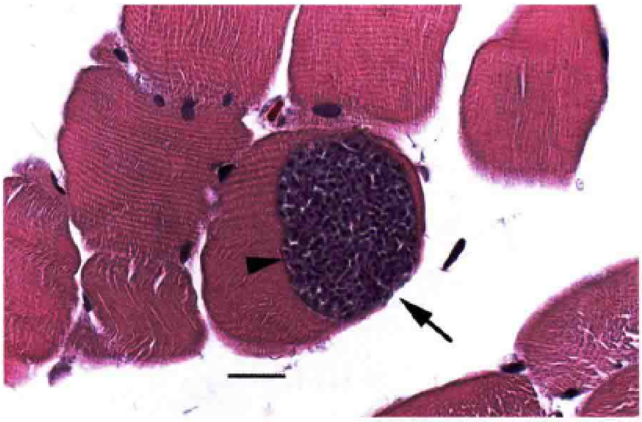


图 144-5

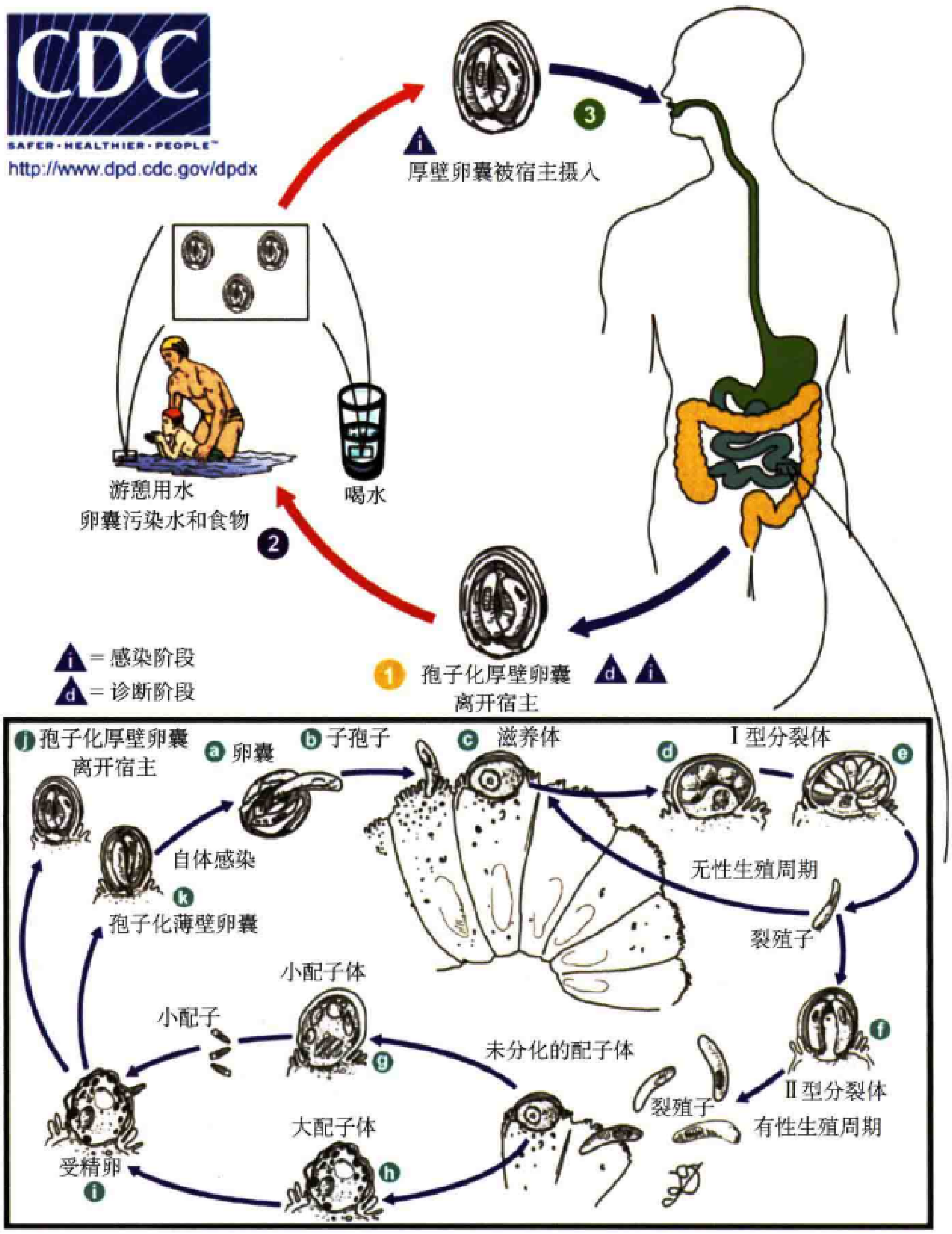


图 145-1

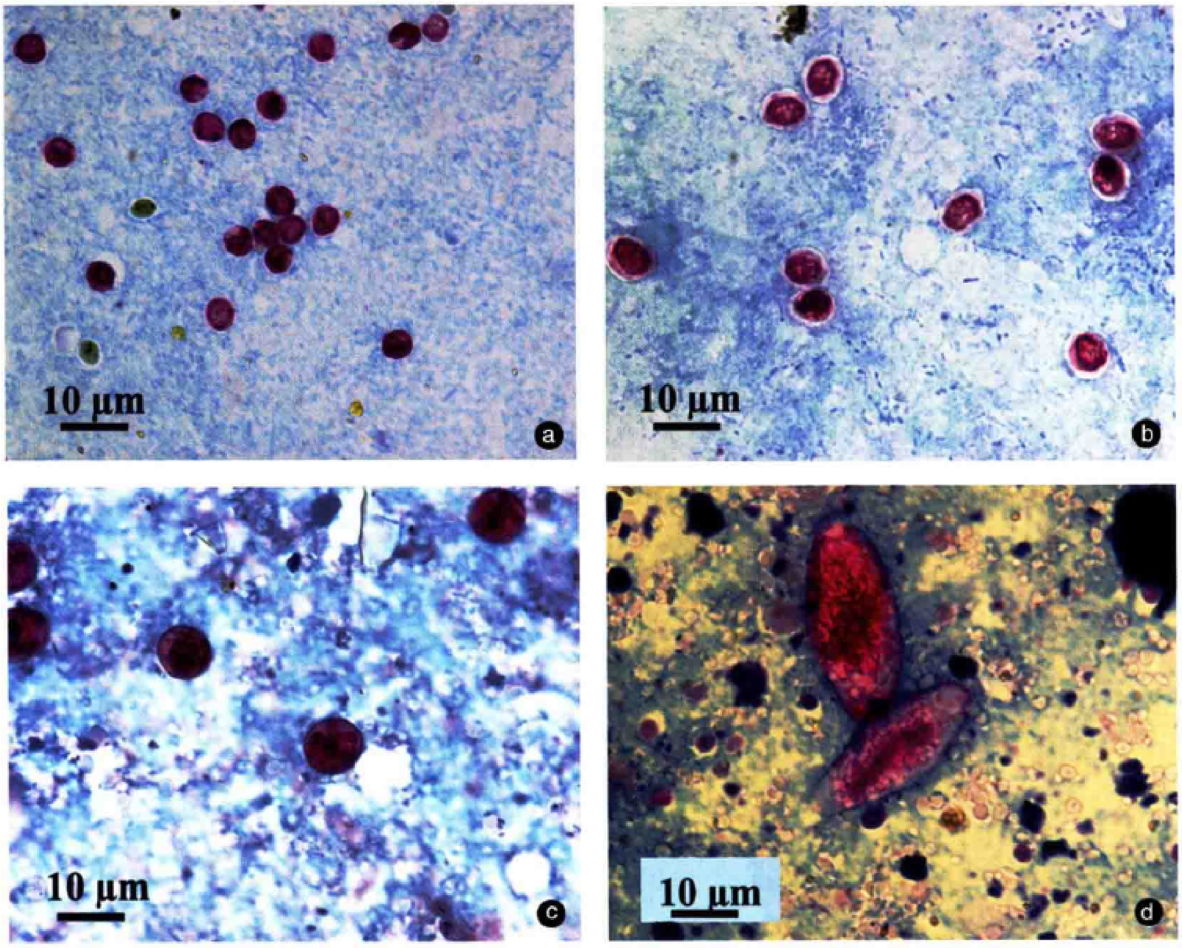


图 145-2

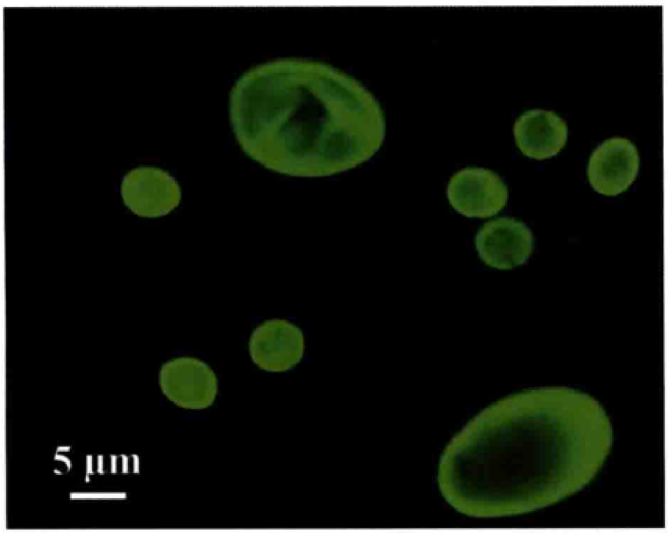


图 145-3

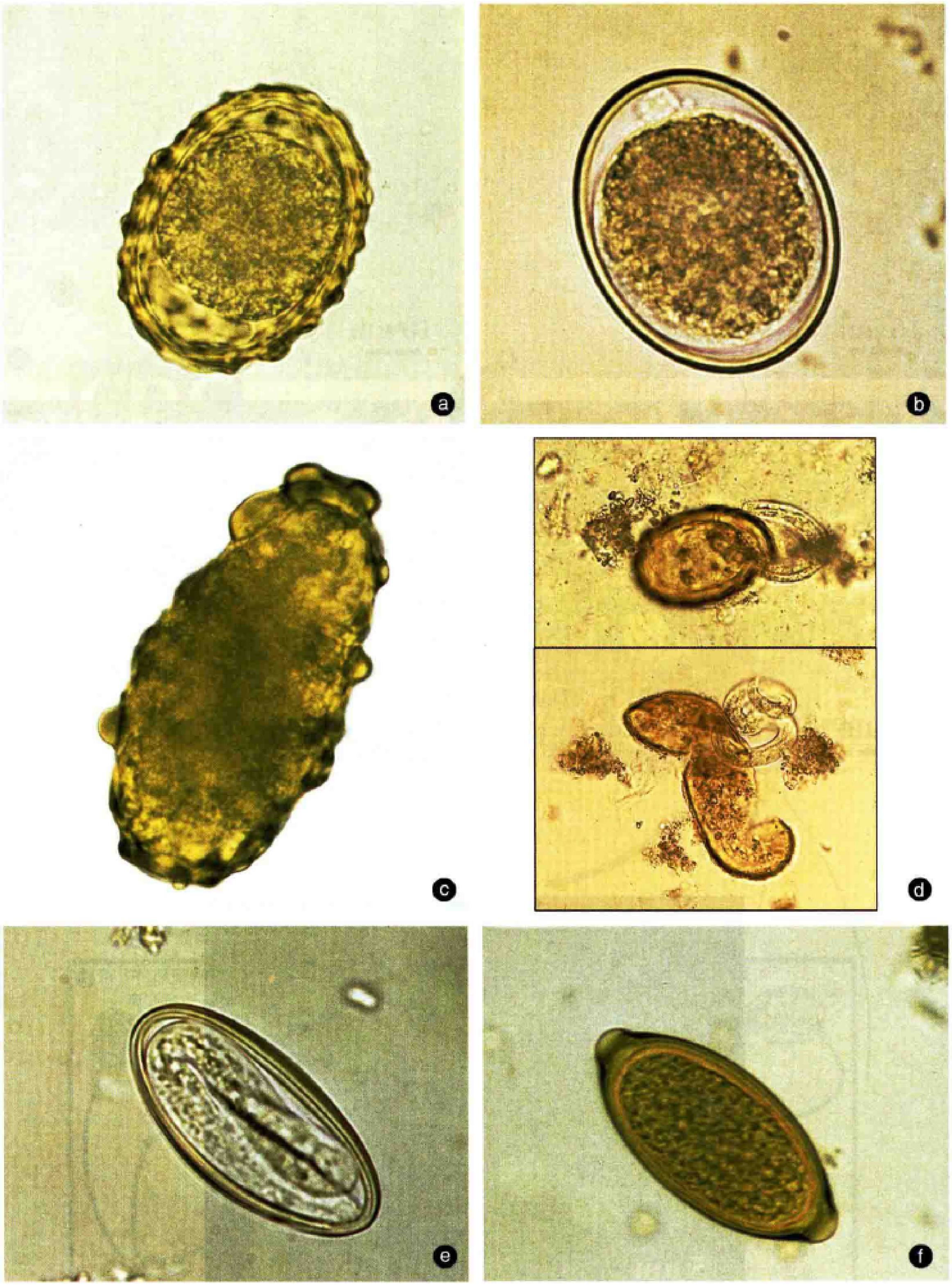


图 146-2

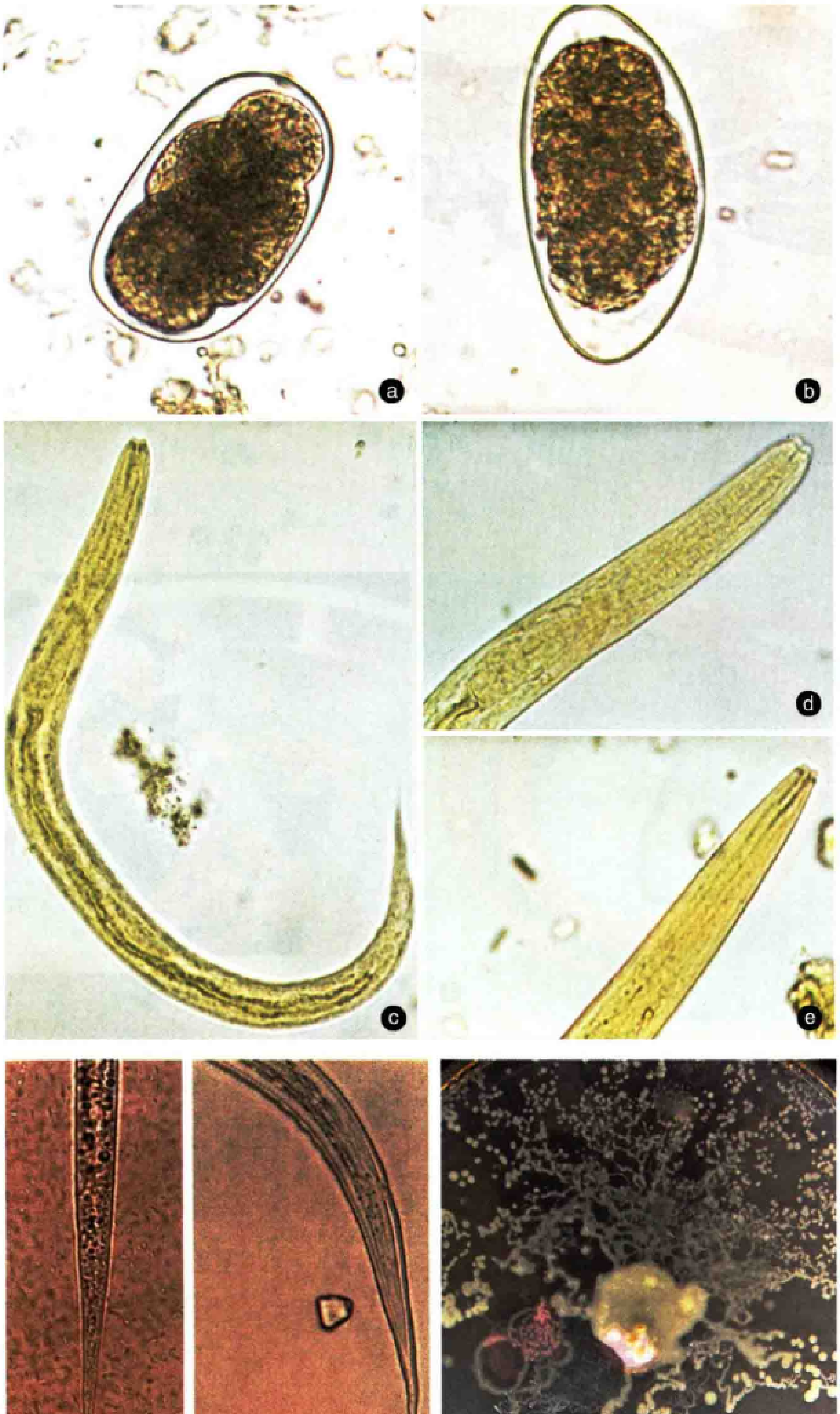


图 146-3

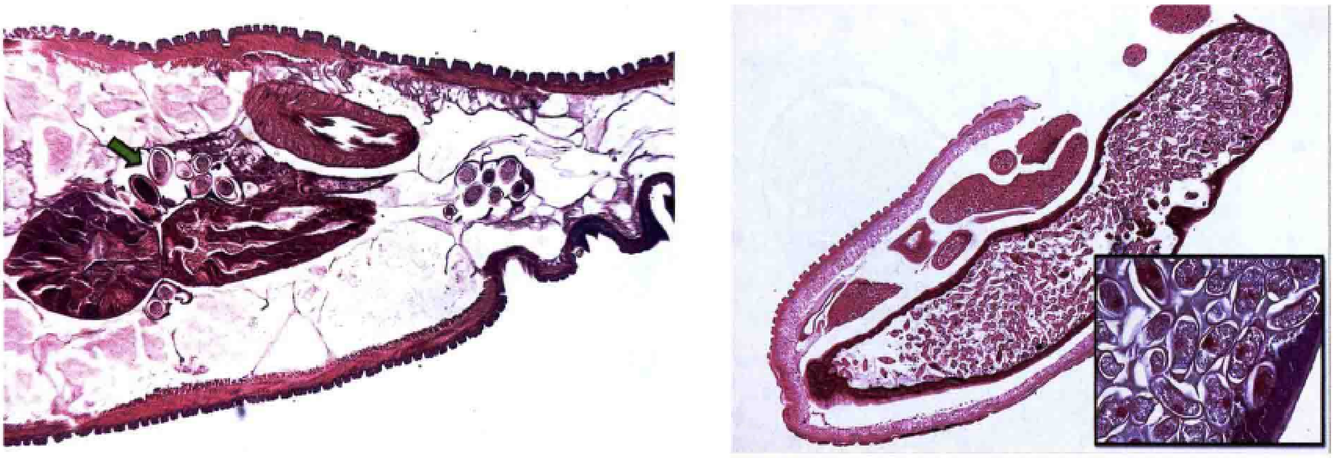


图 146-4

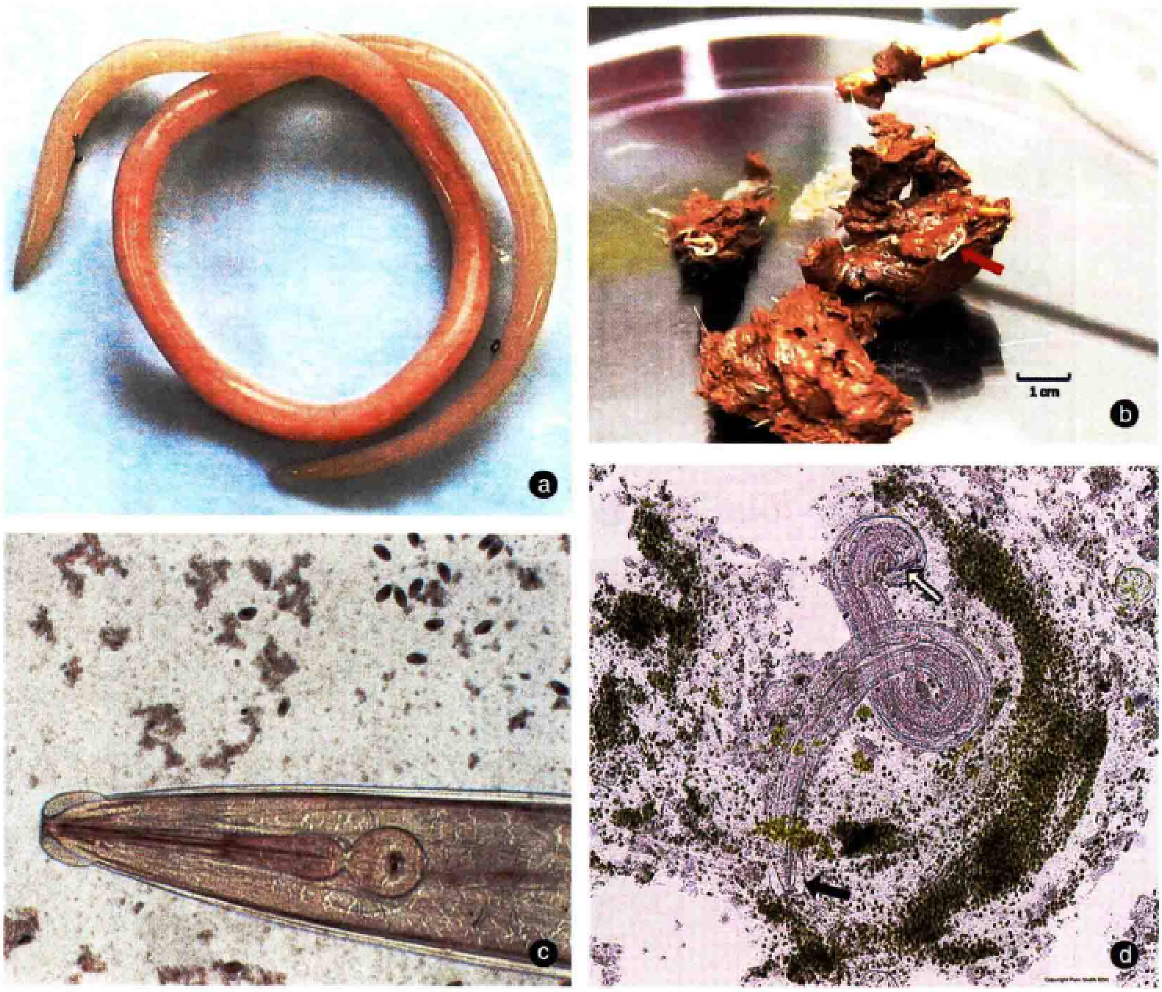


图 146-5



图 147-1

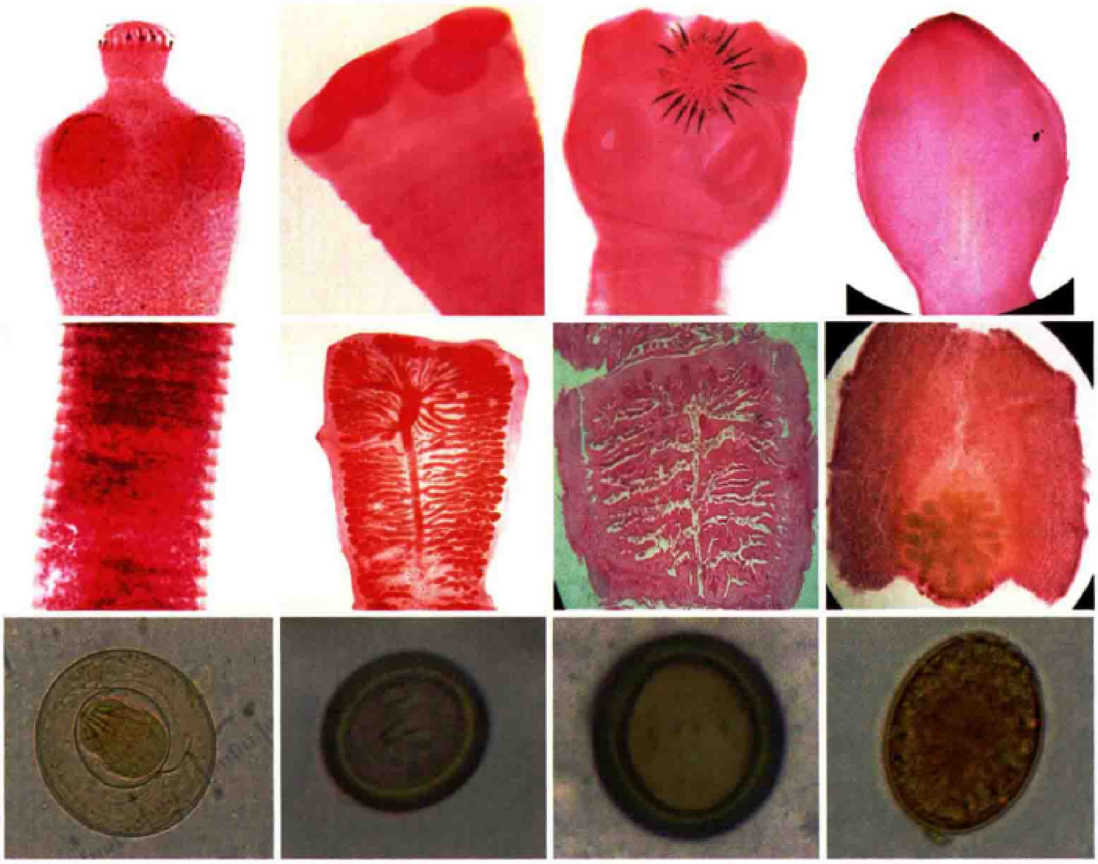


图 148-1

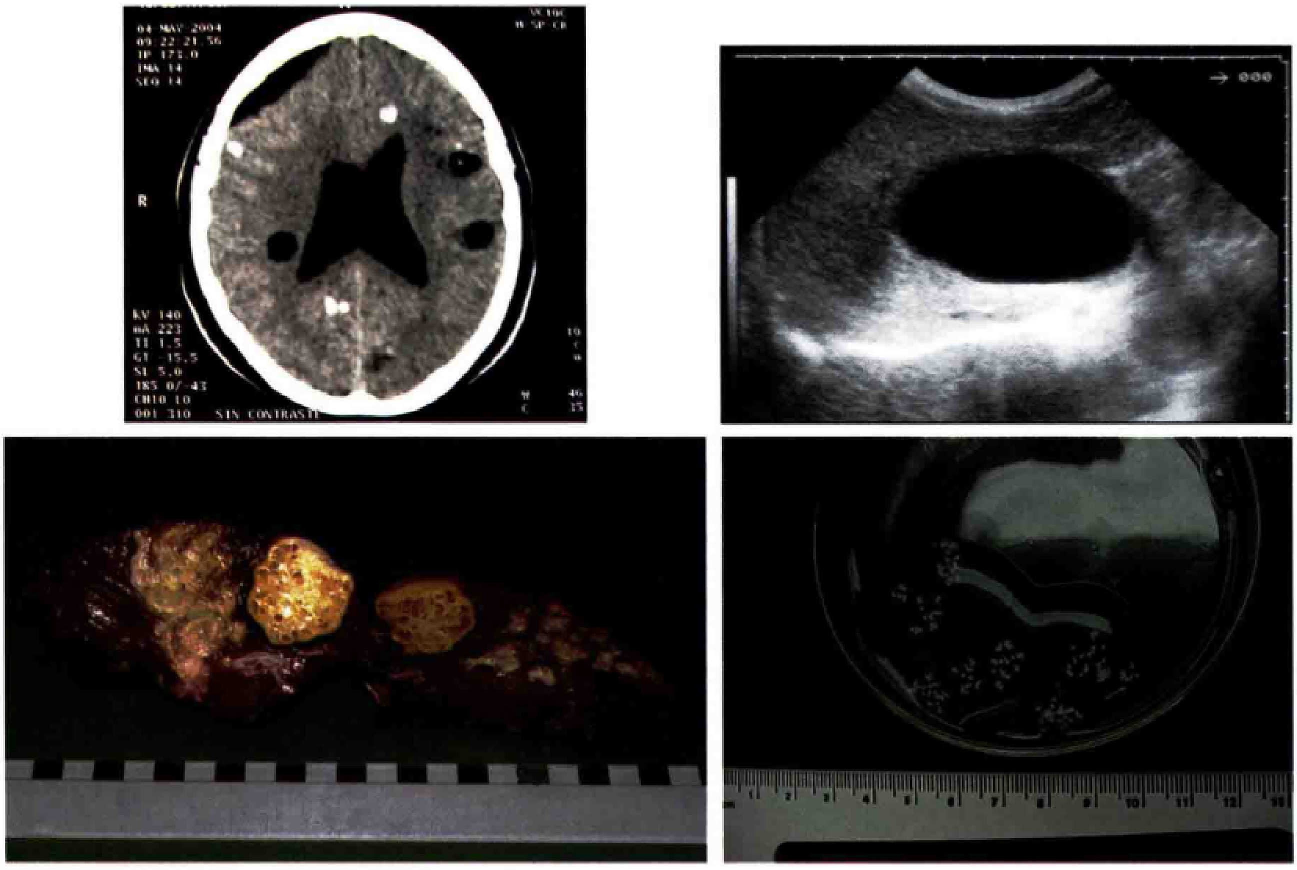


图 148-2

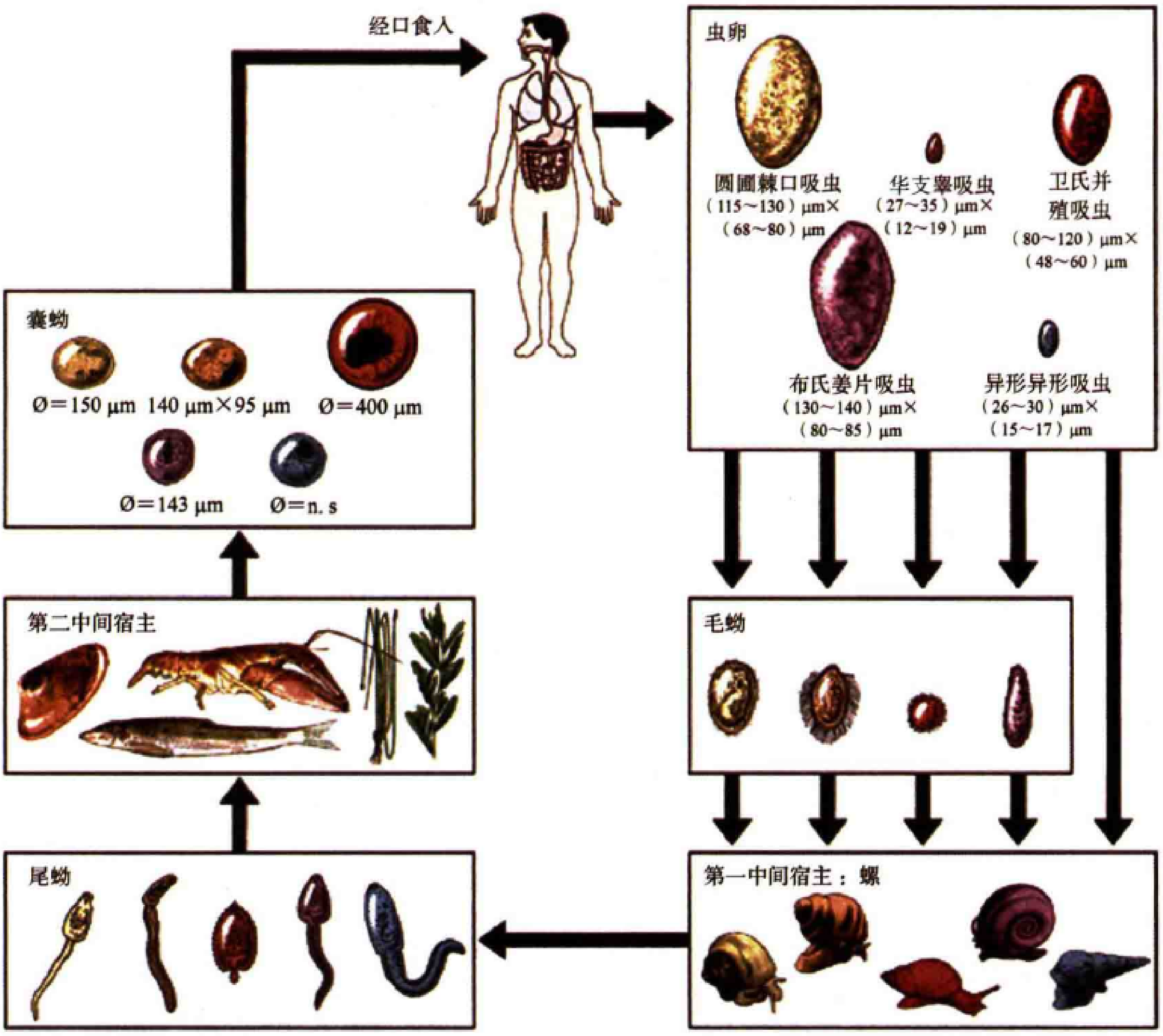

经口食入
虫卵
圆圃棘口吸虫
（115～130）μm×
（68～80）μm
华支睾吸虫
（27～35）μm×
（12～19）μm
卫氏并
殖吸虫
（80～120）μm×
（48～60）μm
布氏姜片吸虫
（130～140）μm×
（80～85）μm
异形异形吸虫
（26～30）μm×
（15～17）μm
囊蚴
Ø＝150 μm
140 μm×95 μm
Ø＝400 μm
Ø＝143 μm
Ø＝n. s
第二中间宿主
毛蚴
尾蚴
第一中间宿主：螺

图 149-2

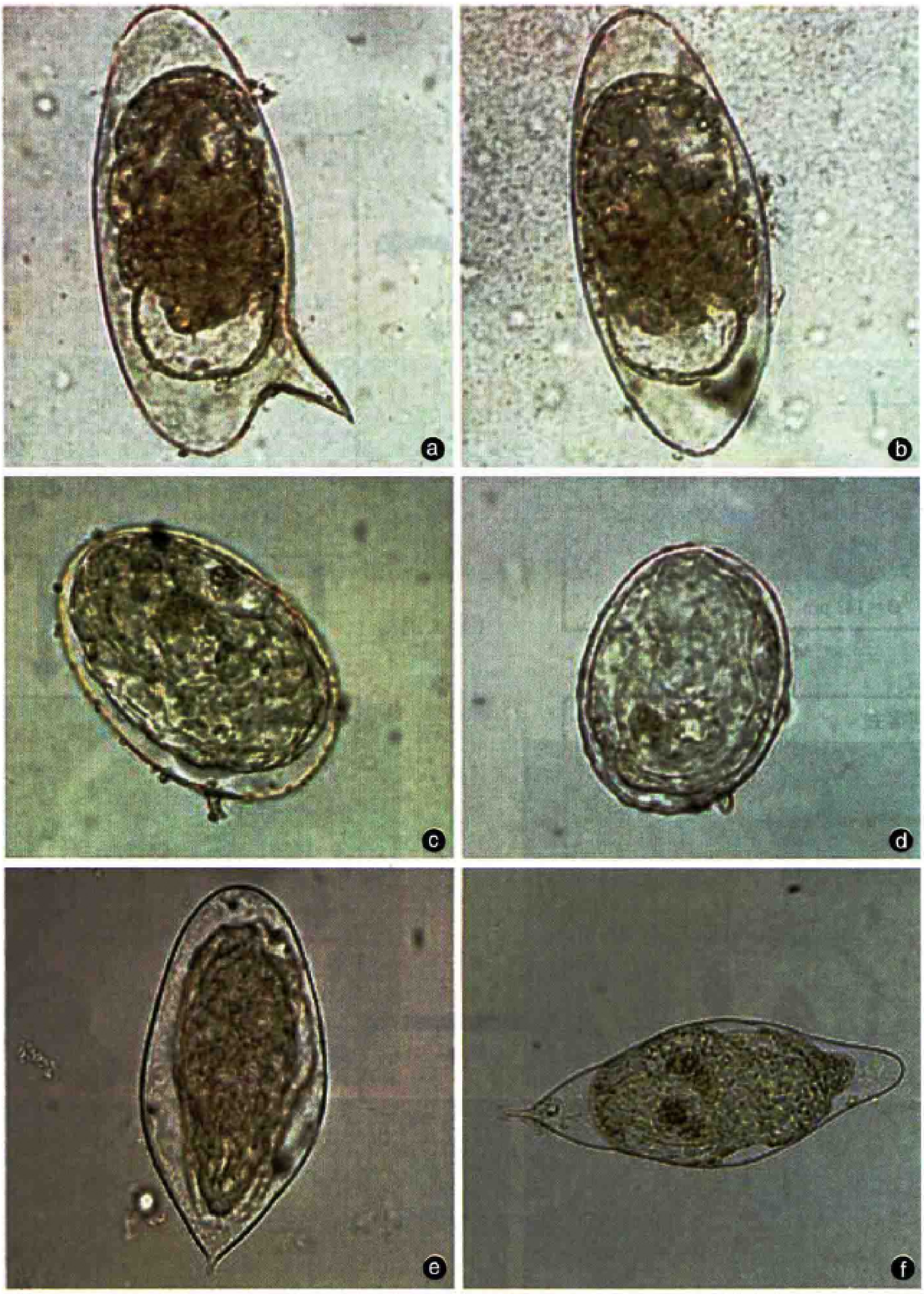


图 149-3

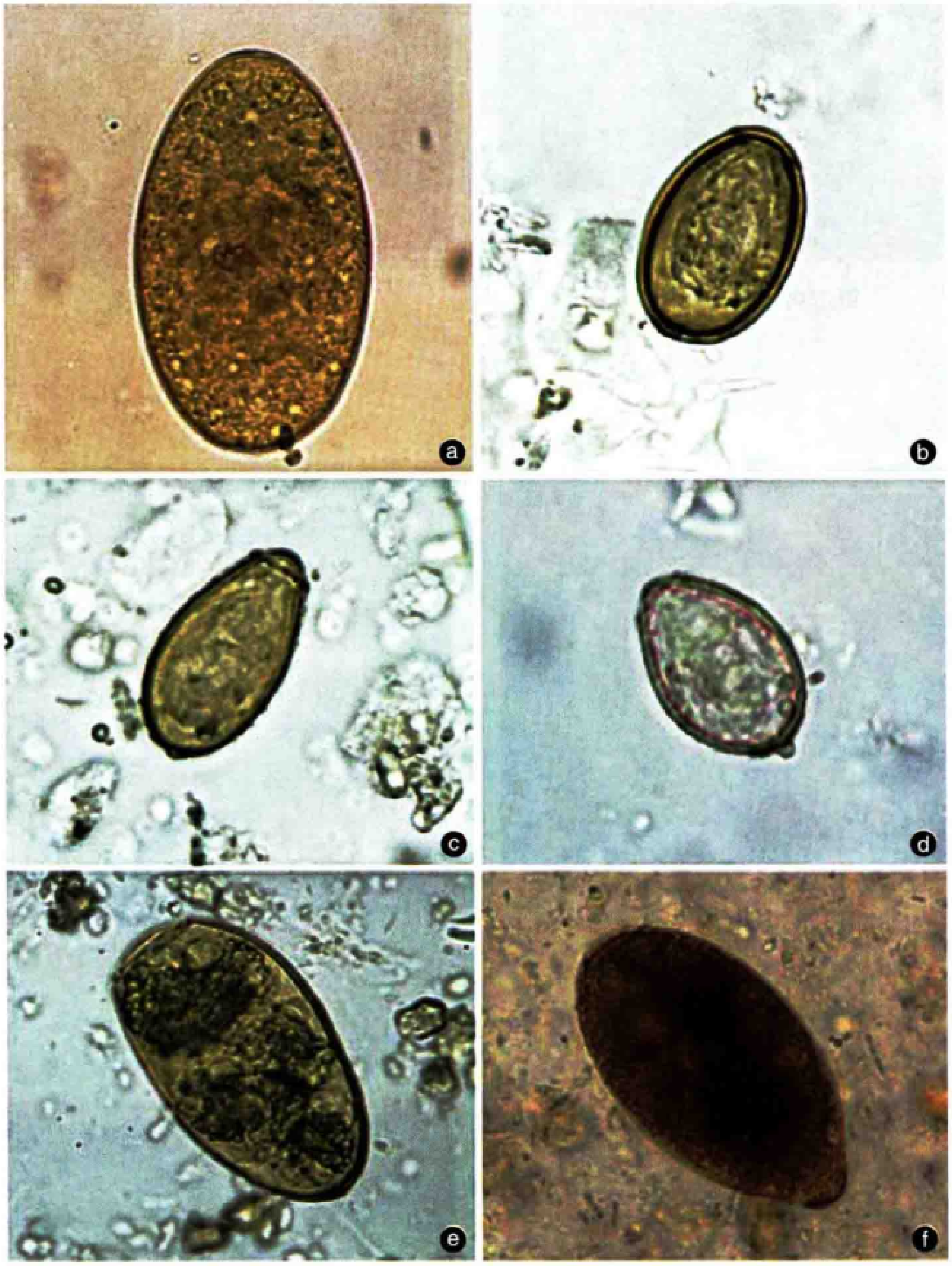


图 149-4


图 150-1


图 150-2

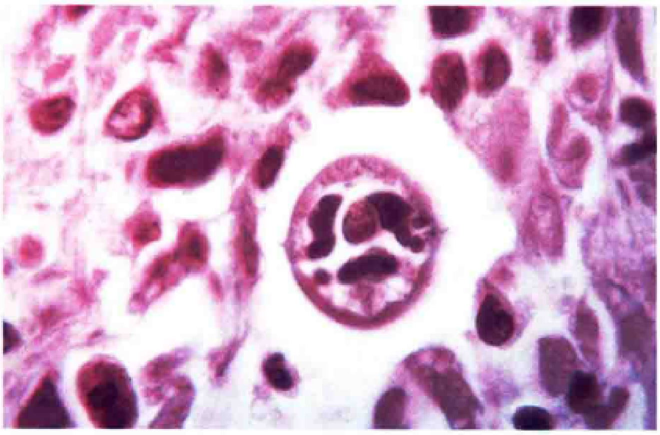

图 150-3


图 150-4

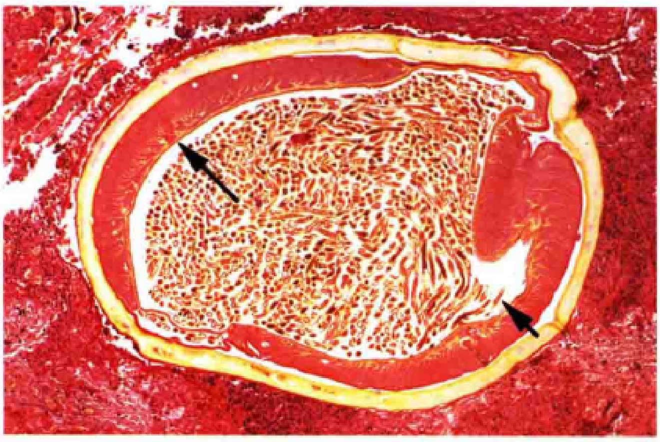

图 150-5


图 150-6

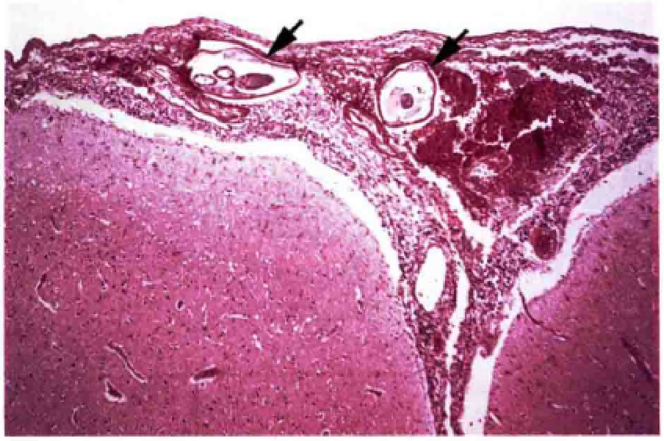


图 150-7



图 150-8

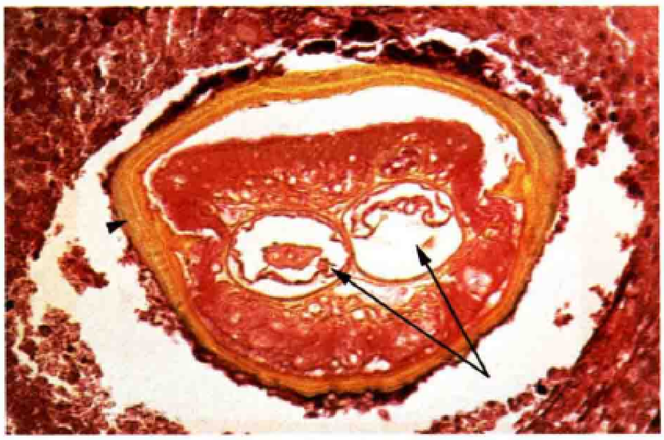


图 150-9



图 150-10



图 150-11

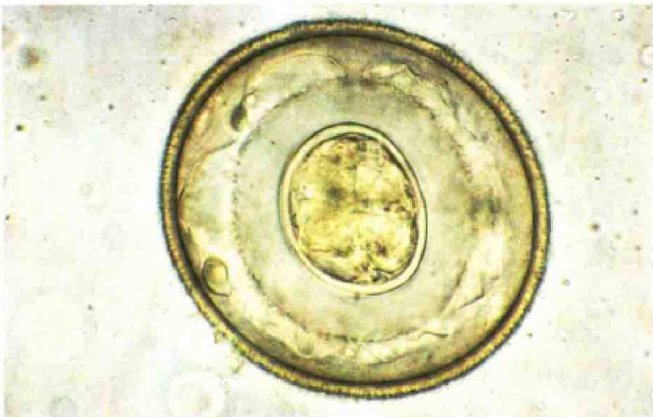


图 150-12



图 150-13



图 151-1



图 151-2

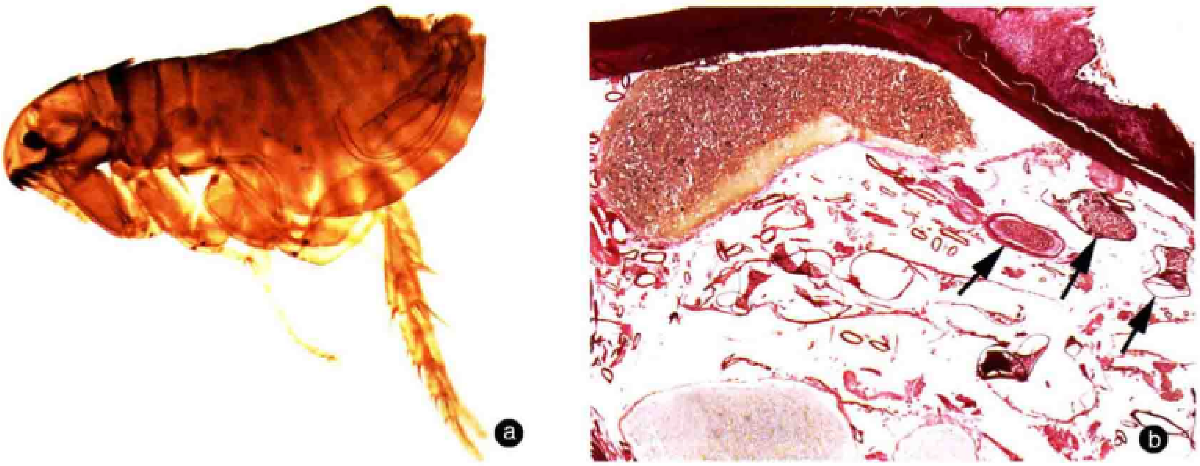


图 151-3

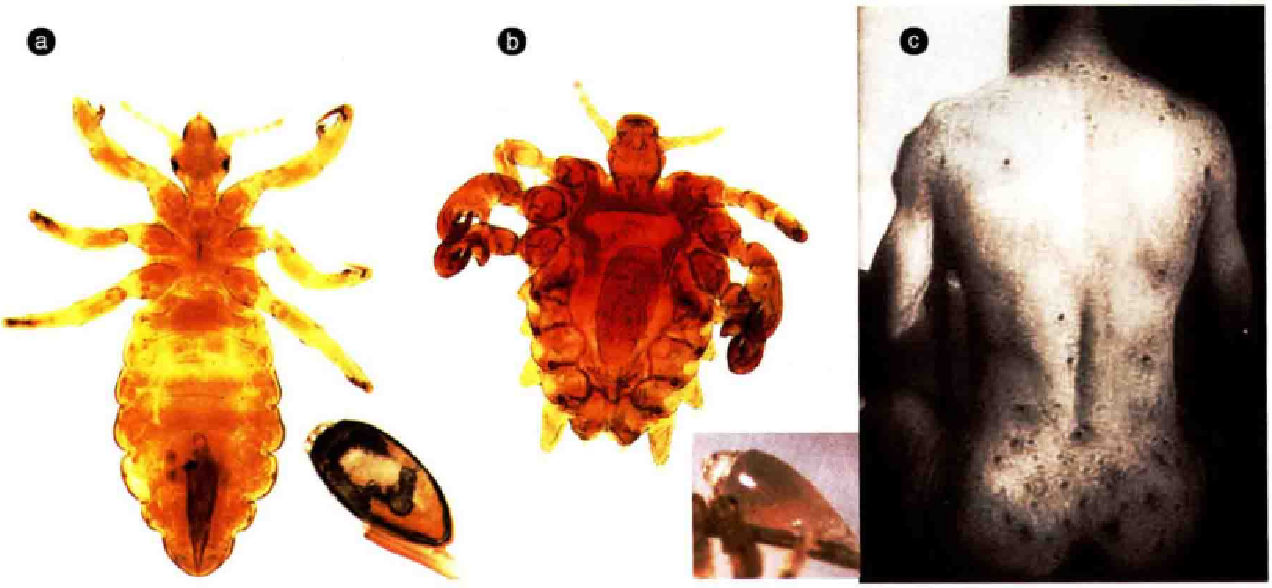


图 151-4

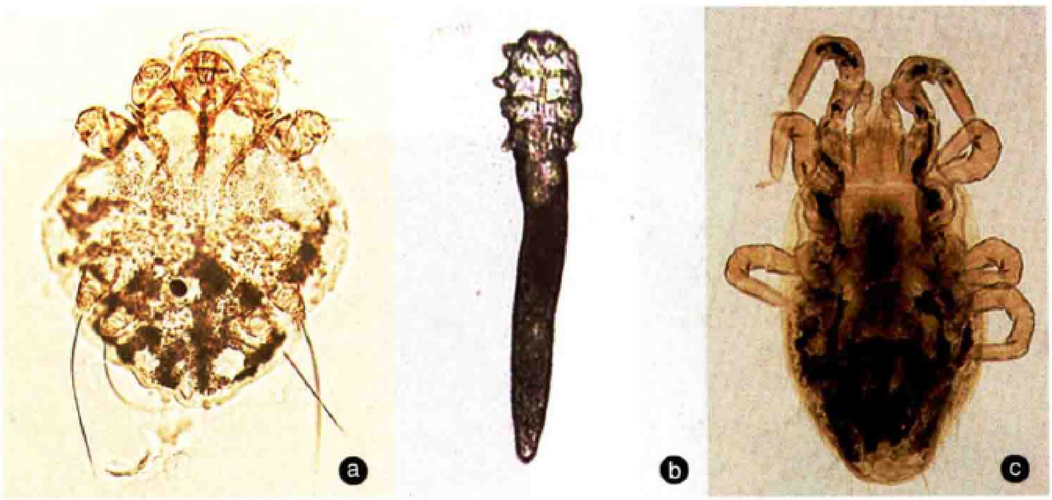


图 151-5



图 151-6

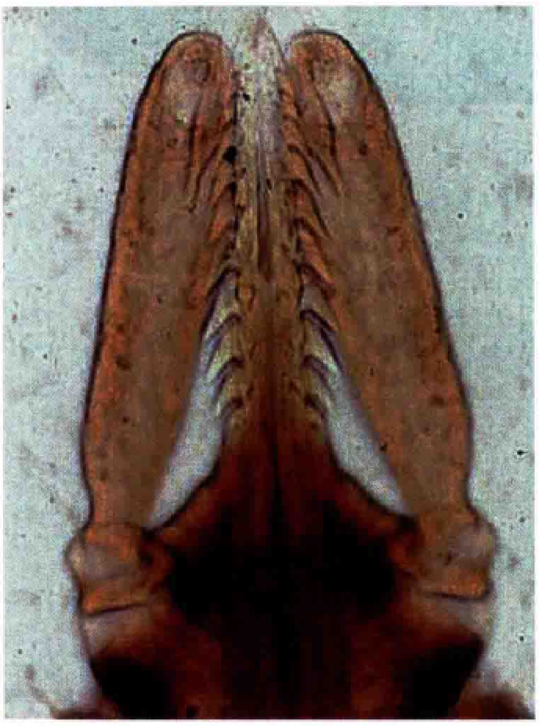


图 151-7



图 151-11

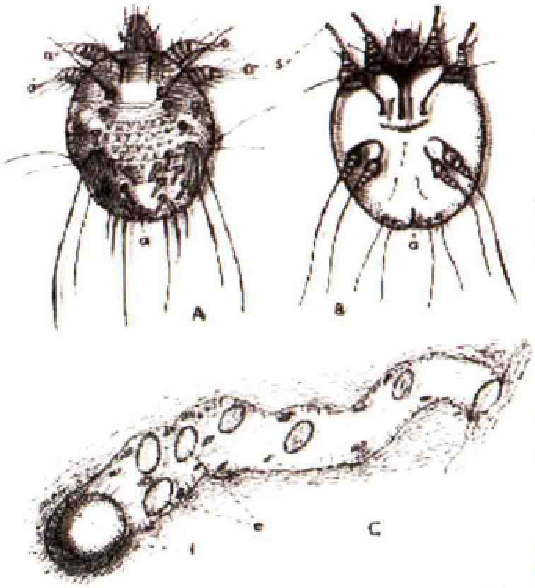




图 151-9